

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS

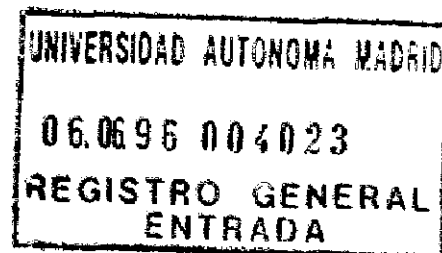
**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN (APA1) IMPLICADO  
EN EL CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE LA  $H^+$ -ATPasa DE LA  
MEMBRANA PLASMÁTICA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.**

Memoria que, para optar al grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas, presenta el Licenciado  
**Mariano Andrés García Arranz**

Director:  
**Dr. Francisco Portillo Pérez**  
Profesor Titular

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina de la U.A.M.

Tutora:  
**Dra. M<sup>a</sup> Jesús Mazón Calpena**  
Investigadora Científica  
Instituto de Investigaciones Biomédicas. C.S.I.C.



Madrid, 1996

RBC.63.773

*Este trabajo fue realizado en el  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
del Consejo Superior de Investigaciones  
Científicas de Madrid.*

***A Belén***

***A Rodrigo***

## **AGRADECIMIENTOS**

*Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Francisco Portillo Pérez y la tutoría de la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Mazón Calpena en el Instituto de Investigaciones Biomédicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.*

*Quiero expresar mi agradecimiento:*

*Al Dr. Francisco Portillo, porque es el alma de este trabajo y le debo todo cuanto de ciencia conozco y de trabajo de laboratorio he aprendido.*

*A las Dras. M<sup>a</sup> Jesús Mazón y Pilar Eraso, por sus enseñanzas, colaboración y apoyo.*

*Al Dr. D. G. Fraenkel, por facilitarme el mutante  $\Delta gcr1$ .*

*Al Dr. R. F. Gaber, por proporcionarme los genes de los transportadores de glucosa.*

*Al Dr. A. Rodríguez Navarro, por proporcionarme el gen del transportador de potasio.*

*A mis compañeros de laboratorio, Lali, Roberto, Ana y Loli, por su ayuda moral y práctica.*

*A mis amigos, Javier por animarme a iniciar mi tesis y Paulino por apoyarme a lo largo de los años de licenciatura.*

*A mi familia, a mis padres, y, especialmente, a mi mujer, Belén, por su cariño y por haberme ayudado y alentado durante estos años.*

**RESUMEN.**

---

*RESUMEN*

En el presente trabajo se han aislado mutaciones en siete genes distintos, que afectan a la regulación de la expresión del gen de la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática de levaduras (PMA1). Se ha clonado y secuenciado uno de estos genes (APA1). Cepas carentes del gen APA1 son defectivas en la regulación de la expresión de PMA1 por glucosa.

*SUMMARY*

We have isolated mutations on seven genes that cause a defective regulation of the PMA1 expression. One of these genes (APA1) was cloned and sequenced. We show that deletion of APA1 affects the glucose-dependent expression of PMA1.

## **ÍNDICE.**

	Pag.
<b>RESUMEN</b> . . . . .	5
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> . . . . .	11
1.1. PAPEL FISIOLÓGICO DE LA H <sup>+</sup> -ATPasa DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LEVADURAS . . . . .	12
1.2. ESTRUCTURA DE LA H <sup>+</sup> -ATPasa . . . . .	14
1.3. MODELO DEL SITIO ACTIVO DE LA H <sup>+</sup> -ATPasa DE LEVADURA . . . . .	17
1.4. REGULACIÓN DE LA ATPasa DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA . . . . .	19
<b>2. OBJETIVOS</b> . . . . .	21
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> . . . . .	23
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO . . . . .	24
3.1.1 Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	24
3.1.2 Cepas de <i>Escherichia coli</i> . . . . .	24
3.2. VECTORES DE CLONACIÓN . . . . .	25
3.3. MEDIOS DE CULTIVO . . . . .	30
3.3.1 Medios de cultivo de <i>E. coli</i> . . . . .	30
3.3.2 Medios de cultivo <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	30
3.4. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN CELULAR . . . . .	31
3.5. MÉTODOS GENÉTICOS . . . . .	31
3.6. PREPARACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS . . . . .	31
3.6.1 Obtención de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> . . . . .	31
3.6.2 Obtención de DNA total de levaduras . . . . .	32
3.6.3 Obtención de RNA total de levaduras . . . . .	32
3.6.4 Extracción de plásmidos de levadura . . . . .	32
3.7. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS . . . . .	32
3.7.1 Electroforesis de DNA . . . . .	32
3.7.2 Electroforesis de RNA . . . . .	33
3.7.3 Electroforesis de proteínas . . . . .	33



---

	<i>Pag.</i>
3.8. SECUENCIACIÓN DE DNA . . . . .	33
3.9. AMPLIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE PCR . . . . .	33
3.10. TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS . . . . .	34
3.10.1 Transferencia de DNA o RNA a un soporte sólido . . . . .	34
3.10.2 Marcaje de sondas radiactivas . . . . .	34
3.10.3 Hibridación de sondas a DNA y RNA fijados a soportes sólidos . . . . .	34
3.11. OBTENCIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES DE LEVADURA . . . . .	35
3.12. VALORACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA . . . . .	35
3.12.1 Valoración de la H <sup>+</sup> -ATPasa . . . . .	35
3.12.2 Determinación de proteína . . . . .	35
3.12.3 Valoración de actividad $\beta$ -galactosidasa . . . . .	35
3.12.4 Valoración del transporte de glucosa . . . . .	36
3.13. MEDIDA DEL pH INTRACELULAR . . . . .	36
3.14. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS . . . . .	36
3.14.1 Purificación de anticuerpos . . . . .	36
3.14.2 Tratamiento de proteínas transferidas a soporte sólido . . . . .	36
3.15. REACTIVOS . . . . .	37
4. RESULTADOS . . . . .	38
4.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES CON BAJOS NIVELES DE ACTIVIDAD H <sup>+</sup> -ATPasa . . . . .	39
4.2. AISLAMIENTO DEL GEN APA1 . . . . .	44
4.3. SECUENCIACIÓN DEL GEN APA1 . . . . .	46
4.4. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE APA1 . . . . .	48
4.4.1 Análisis de las regiones 5' y 3' no codificadas . . . . .	48
4.4.2 Análisis de la región codificada . . . . .	48
4.5. EXPRESIÓN DEL GEN APA1 . . . . .	54
4.6. OBTENCIÓN DE UNA CEPA DE LEVADURA PORTADORA DE UNA DELECCIÓN DEL GEN APA1 . . . . .	57

---

	<i>Pag.</i>
4.7. EFECTO DE LA DELECCIÓN APA1 SOBRE LA H <sup>+</sup> -ATPasa DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA . . . . .	61
4.7.1 Efectos sobre la actividad, constantes cinéticas de la enzima y pH intracelular . . . . .	61
4.7.2 Efectos de la mutación $\Delta$ apa1 sobre los niveles de Pma1 en la membrana plasmática . . . . .	63
4.8. EFECTO DE LA MUTACION $\Delta$ apa1 SOBRE LOS NIVELES DE mRNA . . . . .	64
4.9. EFECTO DE LA DELECCIÓN DE APA1 SOBRE LA REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE PMA1 POR GLUCOSA . . . . .	66
4.10. EFECTO DE LA DELECCIÓN DEL GEN APA1 SOBRE LA EXPRESIÓN DE OTROS GENES . . . . .	67
4.11. LA MUTACIÓN apa1 AFECTA INDEPENDIENTEMENTE A LA EXPRESIÓN DE LOS GENES PMA1, HXT3 Y SNF3 . . . . .	69
4.12. EFECTO DE LAS MUTACIONES apa2-apa7 SOBRE LA EXPRESIÓN DE PMA1 Y HXT3 . . . . .	70
5. DISCUSIÓN . . . . .	72
6. CONCLUSIONES . . . . .	80
BIBLIOGRAFÍA . . . . .	82

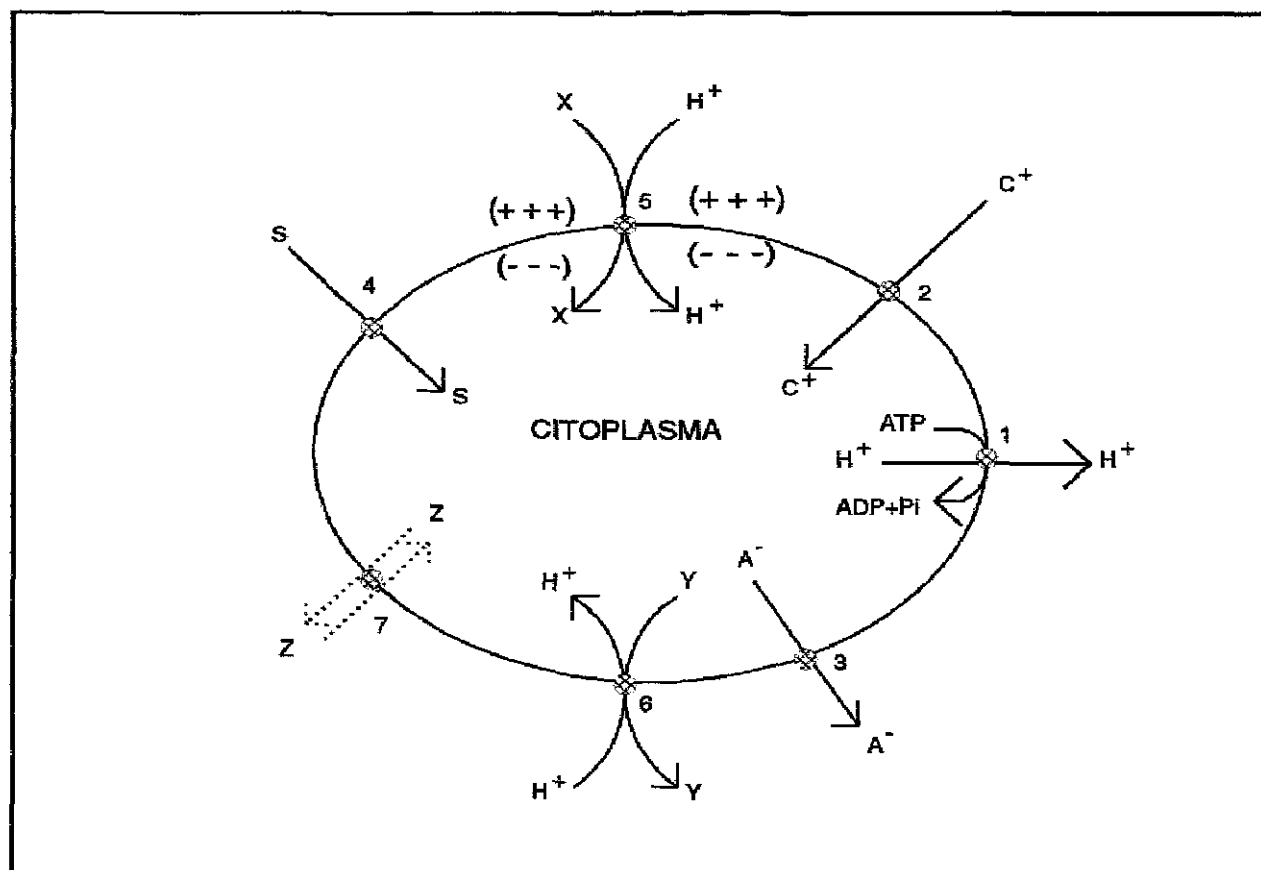
## **CAPITULO 1.-INTRODUCCIÓN.**

### **1.1.- PAPEL FISIOLÓGICO DE LA $H^+$ -ATPasa DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LEVADURAS.**

La  $H^+$ -ATPasa es el componente mayoritario de la membrana plasmática de levaduras, su papel es el de transportar protones al exterior celular, lo que genera un gradiente de pH (Serrano, 1984). Este gradiente de protones tiene dos funciones fisiológicas muy importantes para las células: suministrar la energía necesaria para el transporte activo secundario, y regular el pH intracelular de la levadura (Serrano, 1989).

El gradiente de protones regula el transporte de tres tipos de nutrientes (figura 1.1) (Serrano, 1985). Las moléculas sin carga (azúcares y aminoácidos neutros), pueden cruzar la membrana mediante simporte de protones. El transporte de sustratos aniónicos (cloruro, sulfato, fosfato, lactato, acetato y aminoácidos aniónicos) y el transporte de sustratos catiónicos ( $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  y aminoácidos catiónicos) pueden ser mediados por un simporte con protones, o por canales iónicos (uniporte) dependientes del potencial de membrana, el cual es generado mayoritariamente por la  $H^+$ -ATPasa. Por último, la expulsión de compuestos de desecho a través de la membrana plasmática está mediado por antiportes de protones.

El papel de la  $H^+$ -ATPasa en la regulación del pH intracelular, se infiere del estudio del pH intracelular en mutantes que expresan una ATPasa con baja actividad, o bien expresan bajos niveles de ATPasa (Portillo y Serrano, 1989; Vallejo y Serrano, 1989). En ambos casos se puede establecer una correlación entre la actividad ATPasa y el pH intracelular cuando las levaduras son crecidas en un medio ácido (pH 3-4). Bajo estas condiciones, el crecimiento también está correlacionado con los niveles de actividad ATPasa. Por lo tanto, al menos a pH ácido, la ATPasa es un factor limitante para el crecimiento celular y, es esencial para la regulación del pH.



**Figura 1.1.** Diagrama de mecanismos de transporte conocidos en la membrana plasmática de levaduras: 1.  $H^+$ -ATPasa; 2. Canales de cationes; 3. Canales de aniones; 4. Difusión facilitada de azúcares; 5. Simporte de  $H^+$  ( $x$  = azúcares, aminoácidos,  $P_i$ ,  $SO_4^{2-}$ , purinas, pirimidinas, vitaminas, carboxilatos); 6. Antiporte de  $H^+$  ( $y$  =  $Ca^{2+}$ , S-adenosimetionina,  $Na^+$ ); 7. Difusión pasiva ( $z$  =  $O_2$ ,  $CO_2$ , etanol).

La  $H^+$ -ATPasa de levaduras pertenece a la familia de bombas de iones del tipo E-P (Serrano, 1991) o tipo P (Perdesen y Carafoli, 1987). Estas familias incluyen enzimas como la  $K^+$ -ATPasa bacteriana,  $Ca^{2+}$ -ATPasa de animales y plantas, y  $(Na^+, K^+)$ - y  $(H^+, K^+)$ -ATPasa de animales. Estas ATPasas contienen una subunidad catalítica simple de 70-130 Kda. Se ha descrito una subunidad accesoria en la  $Na^+, K^+$ -ATPasa de células animales (Jorgensen y Andersen, 1988), en la  $K^+$ -ATPasa de *Escherichia coli* (Hesse y col, 1984) y, más recientemente, en la  $H^+$ -ATPasa de levaduras (Navarre y col, 1992). Las enzimas de esta familia se caracterizan porque forman un intermediario aspartil-fosfato durante el ciclo catalítico y son sensibles a vanadato.

## 1.2.- ESTRUCTURA DE LA H<sup>+</sup>-ATPasa.

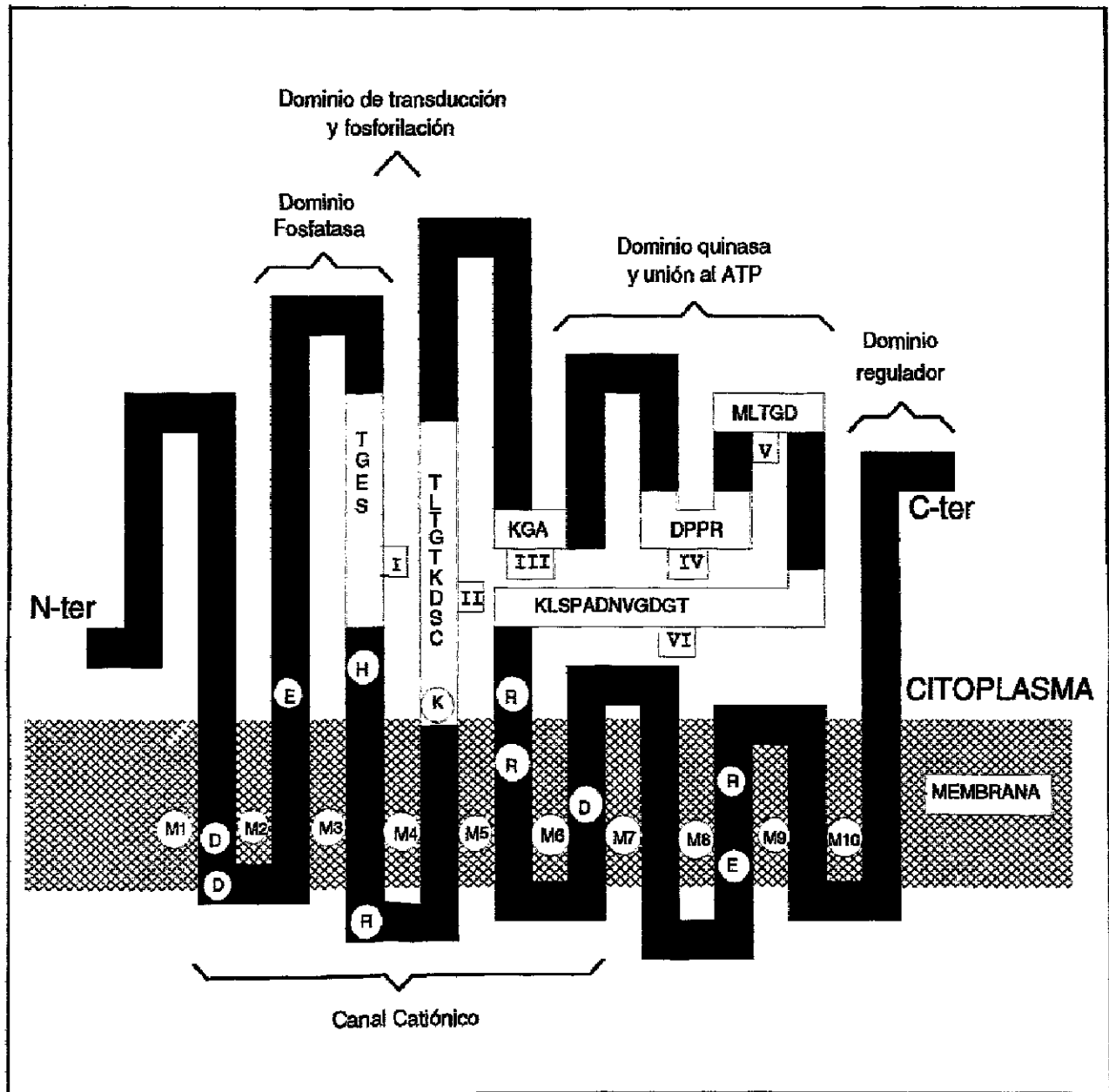
La mayoría de la información obtenida para conocer la estructura de la H<sup>+</sup>-ATPasa, se basa en deducciones a partir de la secuencia de aminoácidos y en estudios comparativos con otros miembros de la familia de la ATPasa.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de varios enzimas de la familia (Serrano, 1989; Goffeau y Green, 1990; Wach y col, 1992) nos hace suponer que todas las (E-P)ATPasas provienen de un origen común (Serrano, 1989; Jorgensen y Andersen, 1988). La homología de secuencia entre las distintas cation-ATPasas de la familia es máxima en las regiones que se muestran en la figura 1.2 (Serrano y Portillo, 1990). Estas regiones incluyen seis motivos especialmente conservados (I-VI), que podrían corresponderse con la maquinaria catalítica básica preservada a lo largo de la evolución (Figura 1.2).

MOTIVOS:	I	II	III	IV	V	VI
Bco	225	374	472	532	555	630
Hsp	223	372	470	529	553	628
Hno	225	374	472	532	555	630
Hcr	228	376	474	534	558	632
Hom	203	351	449	509	532	607
Hef	177	326	422	485	569	585
Hnp	183	330	426	487	513	589
Hle	182	328	425	489	512	586
Nak	211	370	504	589	612	711
Hr	222	381	515	600	623	722
Casr	175	347	513	588	621	698
Capr	238	471	599	682	703	793
Kef	127	274	330	403	426	472
Kec	133	303	393	443	468	514

Figura 1.2. Motivos conservados (I a VI) de (E-P)ATPasa. Los aminoácidos conservados en todas las secuencias se indican (\*) y los conservados en todas menos una o dos secuencias se indican (+). También está indicada la posición del primer aminoácido de cada motivo. Hsc: H<sup>+</sup>-ATPasa de *S. cerevisiae* (gen PMA1). Hsp: H<sup>+</sup>-ATPasa de *Schizosaccharomyces pombe* (gen PMA1). Hnc: H<sup>+</sup>-ATPasa de *Neurospora crassa*. Hcr: H<sup>+</sup>-ATPasa de *Zygosaccharomyces rouxii*. Hca: H<sup>+</sup>-ATPasa de *Candida albicans*. Hle: H<sup>+</sup>-ATPasa de *Arabidopsis thaliana* (gen AHA1). Hnp: H<sup>+</sup>-ATPasa de *Nicotiana glumabiginifolia* (gen PMA1). Hie: H<sup>+</sup>-ATPasa de *Lycopodium obscurum*. Nak: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa de hígado de oveja (subunidad  $\alpha$ ). Hlk: H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa de estómago de ratón. Casr: Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de retículo sarcoplasmático de músculo de conejo. Capm: Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de membrana plasmática humana. Kst: K<sup>+</sup>-ATPasa de *Streptococcus faecalis*. Kec: K<sup>+</sup>-ATPasa de *Escherichia coli* (subunidad B)

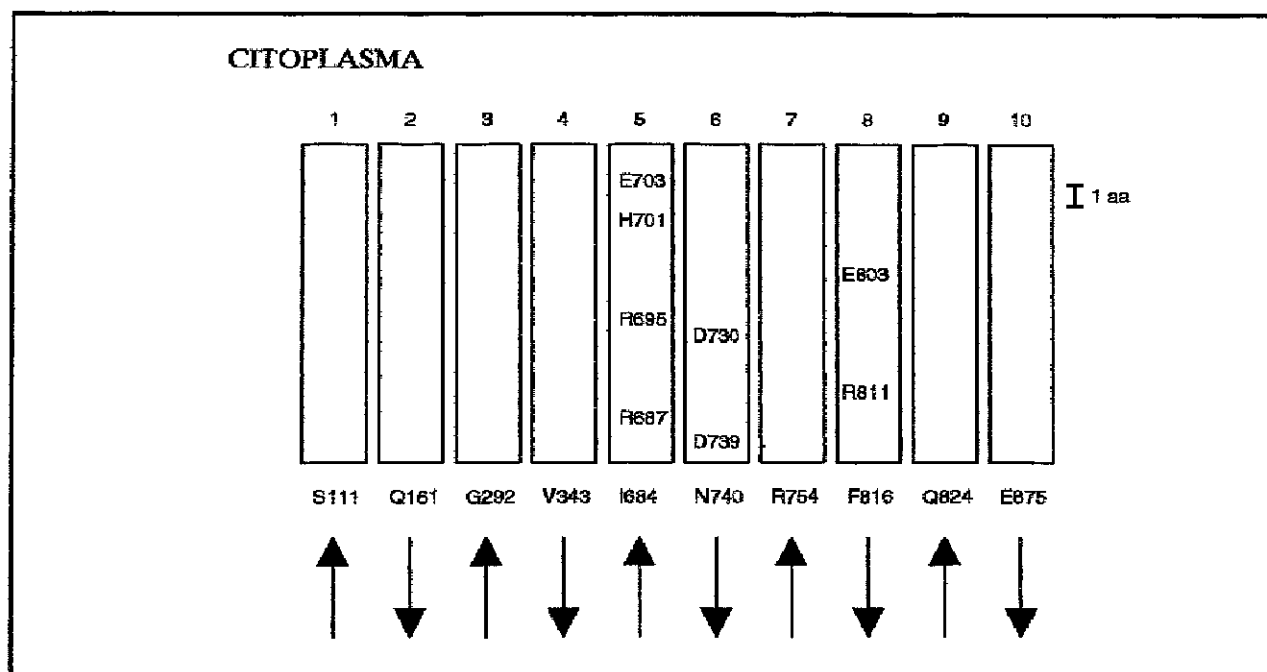
Teniendo en cuenta las limitaciones de los métodos empleados para predecir los segmentos transmembrana, un análisis de hidrofobicidad comparativo de las (E-P)ATPasas (Serrano y Portillo, 1990; Goffeau y Green, 1990) sugiere una estructura consenso con diez hélices transmembrana en todas las ATPasas eucarióticas (figura 1.3).



**Figura 1.3.** Un modelo de los dominios transmembrana de la H<sup>+</sup>-ATPasa. M1-M10 muestra la predicción de 10 hélices transmembrana. La predicción de aminoácidos cargados fuera de la membrana o en las hélices transmembrana y conservados a lo largo de todas las H<sup>+</sup>-ATPasas están marcados con un círculo. La posición de la mayoría de los motivos conservados están indicados mediante rectángulos blancos. La longitud que representan las barras es aproximadamente proporcional al número de aminoácidos de cada dominio.

Este modelo está en concordancia con la localización citoplasmática de los extremos amino y carboxilo de la enzima, como fue determinado mediante el uso de anticuerpos específicos (Mandala y Slayman, 1989; Monk y col, 1991) y con el análisis de péptidos liberados tras el tratamiento con tripsina de la enzima, reconstituido en liposomas (Scarborough y Hennessey, 1990). Todos los motivos conservados se localizan dentro del citoplasma (figura 1.3). El motivo I está ubicado en una pequeña región hidrofílica y los motivos II-VI están situados dentro de un gran dominio central hidrofílico.

En las hélices transmembrana hay una serie de aminoácidos cargados, conservados en todas las  $H^+$ -ATPasas, que podrían formar un canal polar a través de la membrana (figura 1.4), por donde tiene lugar el transporte del protón. Mediante mutagénesis dirigida de estos grupos polares, se ha comprobado que la arginina 695 en la hélice transmembrana M5 y el ácido aspártico 730 en la hélice transmembrana M6, son esenciales para la actividad, por lo que podrían formar parte del mecanismo de transporte del protón, a través de la membrana (Portillo y Serrano, 1990).



**Figura 1.4. Aminoácidos propuestos como implicados en la formación del canal polar a través de la membrana plasmática por la  $H^+$ -ATPasa.** Las flechas indican la dirección (amino → carboxilo) de los 10 dominios transmembrana de la  $H^+$ -ATPasa.



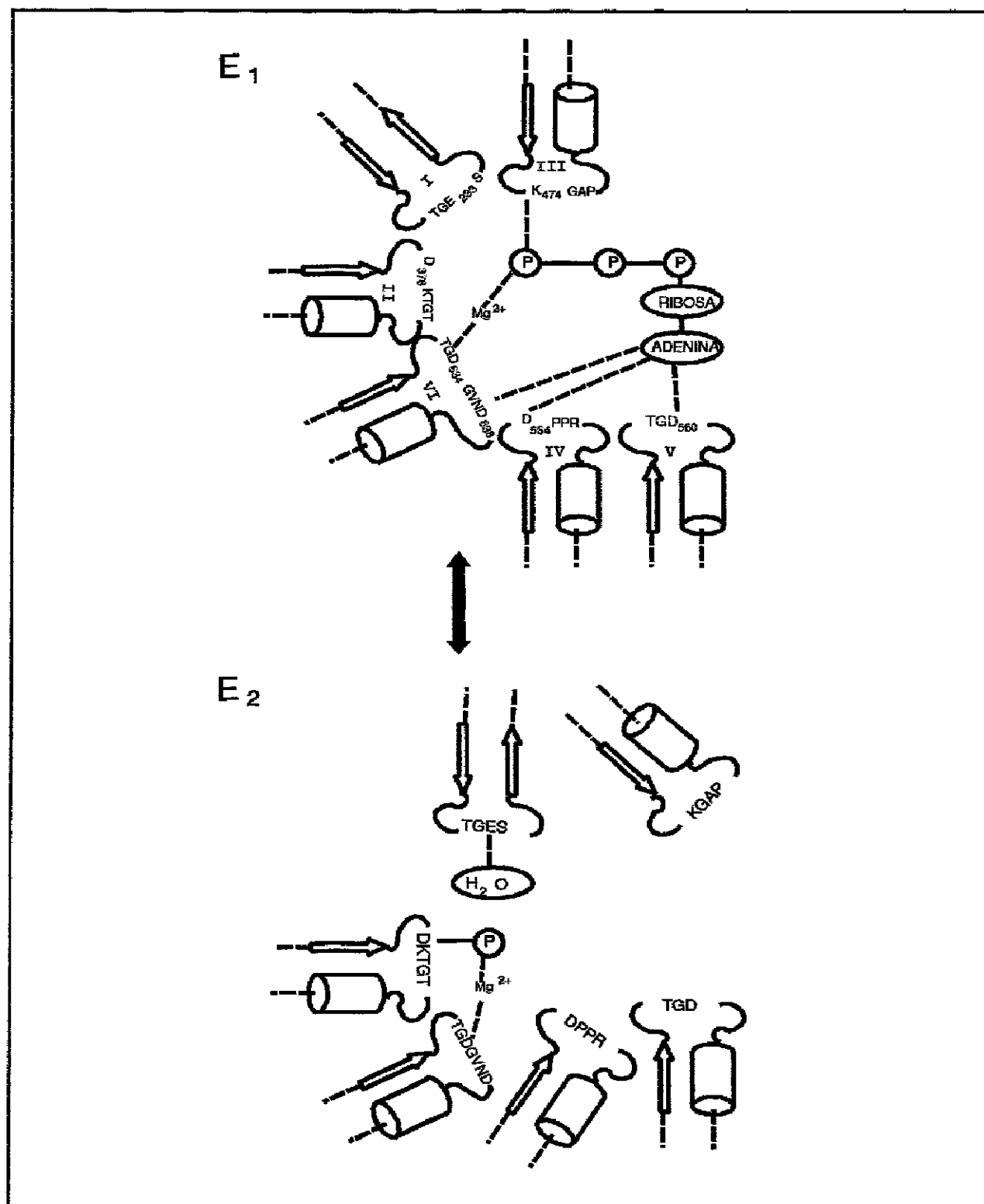
### 1.3.- MODELO DEL SITIO ACTIVO DE LA H<sup>+</sup>-ATPasa DE LEVADURA.

Mediante mutagénesis dirigida, se han obtenido una gran cantidad de mutantes de la H<sup>+</sup>-ATPasa de levadura (Serrano y Portillo, 1990). El análisis "in vivo" e "in vitro" de estos mutantes ha permitido identificar una serie de aminoácidos esenciales para la actividad de la enzima. En la Tabla 1.1 se resumen las funciones propuestas de los distintos dominios conservados y en la figura 1.5 se muestra un modelo del sitio activo y del mecanismo de las (E-P)ATPasas, deducido a partir de estos estudios.

**Tabla 1.1. Secuencia de las regiones conservadas en las H<sup>+</sup>-ATPasas eucariotes y su probable función.**

REGIÓN	FUNCIÓN PROPUESTA
I. DXSX(I,L)TGES	Hidrólisis del intermediario, acoplamiento de la hidrólisis de ATP al transporte del protón
II. (I,L)CSDKTGTLTXN	Intermediario fosforilado, transducción de energía
III. KGA	Unión a ATP (zona: fosfato)
IV. DPXR	Unión a ATP (zona: adenina)
V. MXTGD	Unión a ATP (zona: adenina)
VI. TGDGXNDXPXLKKAXXGXA	Unión a ATP (zona: adenina y fosfato), hidrólisis del intermediario

En la conformación E<sub>1</sub>, las regiones conservadas III y VI podrían formar el sitio de unión del ATP. Los ácidos aspárticos 534, 560 y 638 (en las regiones IV, V y VI respectivamente) parecen participar en la unión a adenina, ya que, mutaciones producidas en estos aminoácidos, disminuyen la especificidad por el nucleótido en la enzima (Portillo y Serrano, 1988).



**Figura 1.5. Modelo del sitio activo y mecanismo de (E-P)ATPasas.** Los motivos representados corresponden a los dominios conservados de la figura 1.2 y de la tabla 1.1. Las  $\alpha$ -hélices se representan como cilindros y las cadenas- $\beta$  se representan como flechas. La conformación que cataliza la formación del intermediario fosforilado se denomina E<sub>1</sub> y la conformación que cataliza la hidrólisis del intermediario se denomina E<sub>2</sub>.

Después de la transferencia del grupo fosfato y del ATP al ácido aspártico 378 en el dominio conservado II, la enzima cambia a la conformación  $E_2$ . Se ha comprobado que la formación del aspartil-fosfato es esencial para la actividad de la enzima (Portillo y Serrano, 1988). La prolina 335 situada en la hélice transmembrana M4 es esencial para la actividad (Portillo y Serrano, 1988), y parece participar en el cambio conformacional  $E_1 \rightarrow E_2$  de la enzima (Brandl y Deber, 1986).

En la conformación  $E_2$ , el intermediario fosforilado es hidrolizado y el protón es bombeado hacia el exterior. Mediante mutagénesis dirigida, se ha observado que el ácido glutámico 233, situado en el dominio conservado I, es importante para la hidrólisis del intermediario fosforilado (Portillo y Serrano, 1988). Otras mutaciones en el mismo dominio (ácido aspártico 226 y serina 234) dan una enzima en la que se desacopla la hidrólisis del ATP (Portillo y Serrano, 1989). Estos resultados sugieren que el dominio conservado I es esencial para el acoplamiento de la hidrólisis del ATP al transporte de protones.

Finalmente, aunque no se muestra en la figura 1.5, la arginina 695 situada en la hélice transmembrana M5 y el ácido aspártico 730 situado dentro de la hélice transmembrana M6 (Portillo y Serrano, 1989) (figura 1.3) podrían formar parte de una vía de transporte de protones a través de la membrana plasmática, ya que son esenciales para la actividad de la enzima.

#### **1.4.- REGULACIÓN DE LA ATPasa DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.**

En las células de levadura, la actividad y la expresión de la ATPasa está regulada por diferentes factores ambientales (Serrano, 1983; Tuduri y col., 1985; Lentzen y col., 1987; Eraso y Gancedo, 1987; Rosa y Sá-Correia, 1991; Benito y col., 1992; Amigo y col., 1993), de los cuales el mejor conocido es

---

la presencia de glucosa en el medio de cultivo. La regulación de la ATPasa por glucosa tiene lugar a dos niveles.

A nivel post-transcripcional, la glucosa induce un estado activado de la enzima debido a la modificación reversible de los parámetros cinéticos  $K_m$ ,  $V_{max}$  y pH óptimo (Serrano, 1983). Esta regulación está mediada por fosforilación (Rao y Slayman, 1993) y en ella parece que el extremo carboxi-terminal de la enzima actúa como un dominio autoinhibitorio (Portillo y col., 1989 y Portillo y col., 1991) que interacciona con otros dominios funcionales para limitar la entrada del ATP y de los protones al sitio activo (Eraso y Portillo, 1994). En el modelo propuesto para explicar esta regulación, la adición de glucosa provocaría la fosforilación de 2 aminoácidos situados en el extremo carboxilo (Ser 899 y Thr 912), lo que daría lugar a un cambio conformacional que haría desaparecer la interacción inhibidora (Eraso y Portillo, 1994).

A nivel transcripcional, la glucosa aumenta la expresión de PMA1 mediante un mecanismo desconocido (Rao y col., 1993). La expresión de PMA1 también se encuentra regulada por el factor transcripcional TUF/RAP1/GRF1 (Capieaux y col., 1989). El hecho de que en la expresión del factor TUF/RAP1/GRF1 esté a su vez regulada por glucosa (Capieaux y col., 1989), es lo que ha llevado a proponer que la regulación de la expresión del gen de la ATPasa por glucosa, tiene lugar a través del factor transcripcional TUF/RAP1/GRF1 (Rao y col., 1993).

## **CAPITULO 2.-OBJETIVOS.**

El objetivo que nos propusimos a lo largo del trabajo, fue aislar y caracterizar genes implicados en la regulación de los niveles de ATPasa de la membrana plasmática de levaduras.

## **CAPITULO 3.- MATERIALES Y MÉTODOS.**

### 3.1.- MATERIAL BIOLÓGICO.

#### 3.1.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas a lo largo del presente trabajo con su genotipo correspondiente, se detallan en la tabla 3.1. Todos los mutantes afectados en sus niveles de ATPasa se obtuvieron a partir de la cepa BWG 1-7A.

Tabla 3.1. Cepas de *S. cerevisiae*.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
BWG 1-7A	MAT a ade1-100 his4-519 leu2-3,112 ura3-52	Guarente y col, 1982
A10700B	MAT $\alpha$ thr 4	Portillo y Mazón, 1986
DFY 642	MAT a leu2-3,112 ura3-52	Uemura y Fraenkel, 1990
DFY 645	MAT a $\Delta$ gcr1::LEU2 leu2-3,112 ura3-52	Uemura y Fraenkel, 1990
H-5	MAT a ade1-100 his4-519 ura3-52 leu2-3,112 apa1-1	Este trabajo
MG2-2C	MAT a ade1-100 his4-519 ura3-52 leu2-3,112 $\Delta$ apa1::URA3	Este trabajo

#### 3.1.2. Cepas de *Escherichia coli*.

Las cepas de *Escherichia coli* que se utilizaron para la propagación



de plásmidos fueron, indistintamente TG1 y DH5 $\alpha$ . La cepa XL1-blue se utilizó para la transfección con los vectores fágicos M13mp 18 y 19 (Messing, 1983). (Tabla 3.2)

**Tabla 3.2. Cepas de *E. coli*.**

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
TG1	F'(traD 36 proAB <sup>+</sup> lac <sup>f</sup> lacZ $\Delta$ M15) supE hsd $\Delta$ 5 thi $\Delta$ (lac-proAB)	Sambrook y col., 1982
DH5 $\alpha$	[F <sup>-</sup> mcrA mcrB mrr phid80 lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lac(ZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR hsdM supE44 $\lambda$ -thi-1 gyrA9 relA]	Hanahan y col., 1983
XL1 Blue	{[F <sup>-</sup> proAB lac <sup>q</sup> $\Delta$ ZM15 Tn10 (tet) <sup>R</sup> ] recA endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 $\lambda$ -(lac)}	Bullock y col., 1987

### 3.2.- VECTORES DE CLONACIÓN.

Para la realización de todas las construcciones genéticas, amplificación y secuenciación de los genes mutados, se utilizaron los plásmidos pUC18 y pUC19, y los vectores fágicos M13mp18 y 19 (figura 3.1). Para la transformación de levaduras se han utilizado los plásmidos que se muestran en la tabla 3.3 y figura 3.1.

**Tabla 3.3. Plásmidos utilizados para la transformación de levadura.**

NOMBRE	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
YCp50	Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , URA3, CEN	Rose y col., 1987
YEp351	Amp <sup>R</sup> , 2 $\mu$ , LEU2	Hill y col., 1986
YEp352	Amp <sup>R</sup> , 2 $\mu$ , URA3	Hill y col., 1986
YEp357R	Amp <sup>R</sup> , 2 $\mu$ , URA3, LacZ	Myers y col., 1986
pRS315	Amp <sup>R</sup> , LEU2, CEN	Sikorski y Hieter, 1989
pRS316	Amp <sup>R</sup> , URA3, CEN	Sikorski y Hieter, 1989
pSB32	Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , LEU2, CEN	Rose y col., 1987

El plásmido pJJ242 (Jones y Prakash, 1990), figura 3.1, se usó para obtener el gen URA3 de levadura, que a su vez se utilizó para la interrupción del gen APA1.

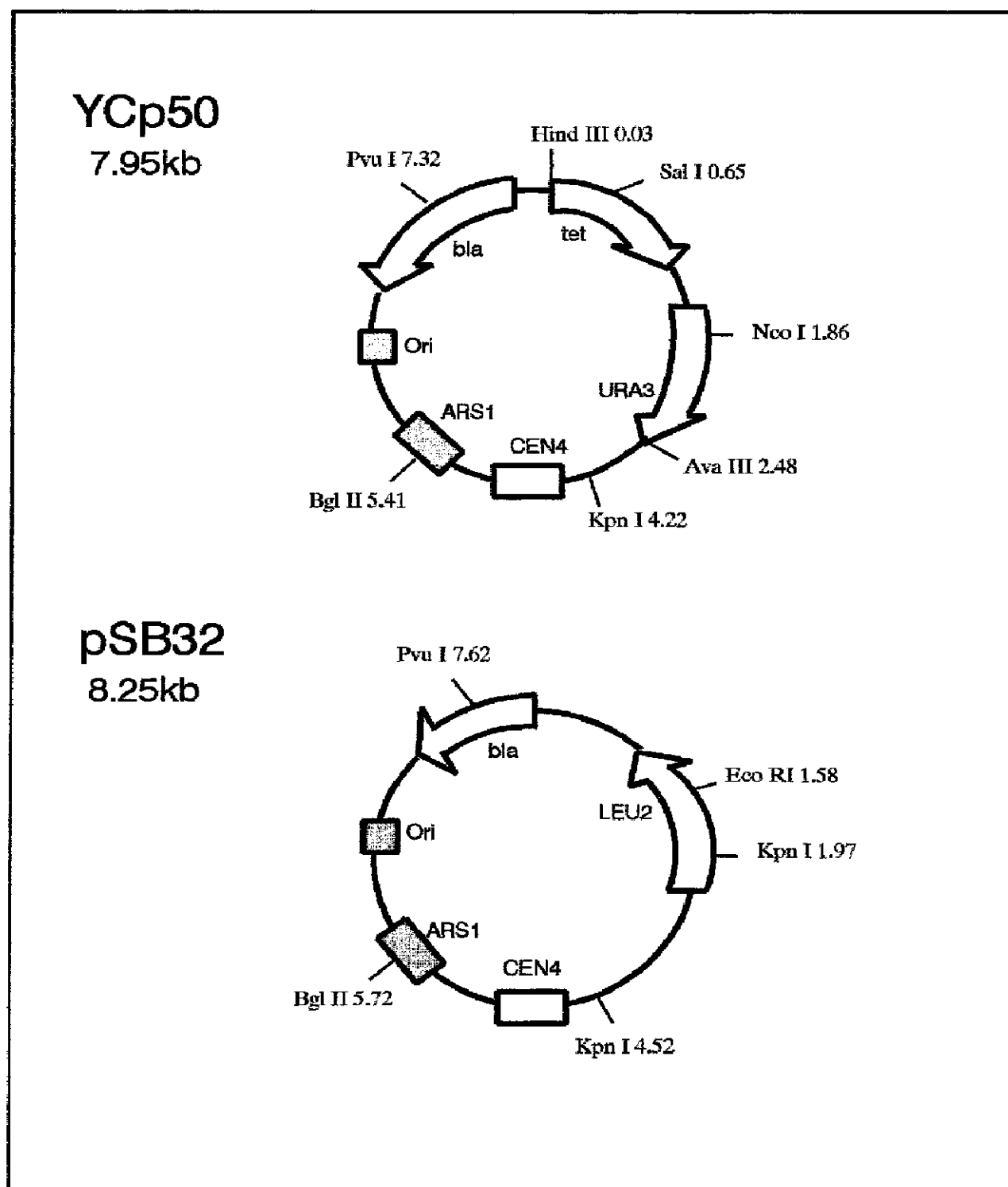
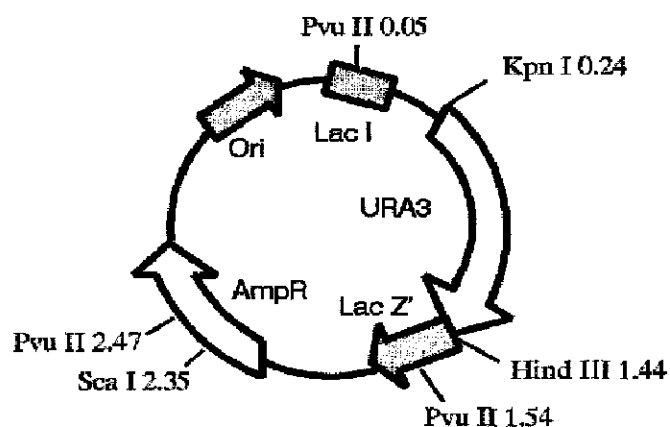
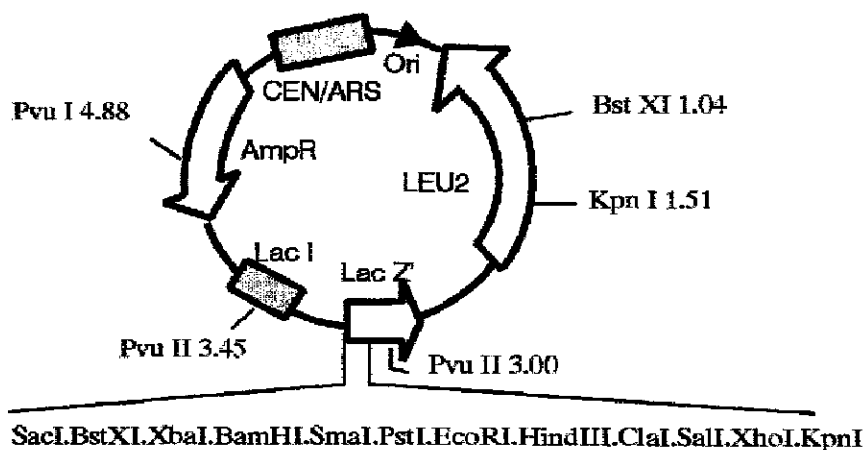


Figura 3.1. Mapa de los plásmidos empleados en este trabajo.

**pJJ242**  
3.85kb

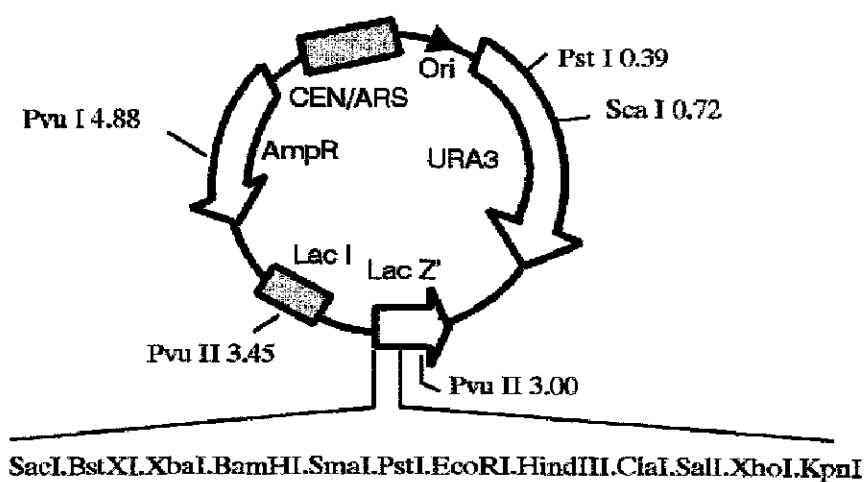


**pRS315**  
6.02kb



SacI, BstXI, XbaI, BamHI, SmaI, PstI, EcoRI, HindIII, ClaI, SalI, XhoI, KpnI

**pRS316**  
6.12kb

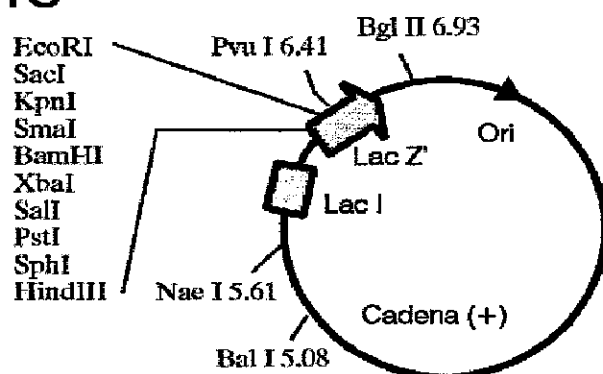


SacI, BstXI, XbaI, BamHI, SmaI, PstI, EcoRI, HindIII, ClaI, SalI, XhoI, KpnI

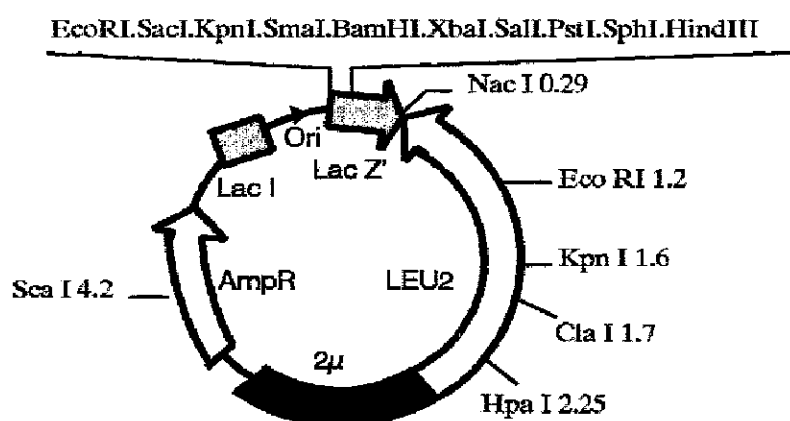
**Figura 3.1. Continuación.**

**M13mp18**

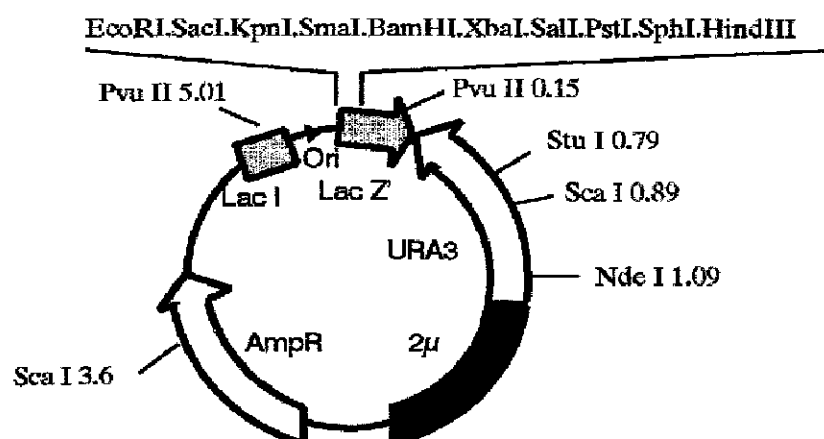
7.25kb

**YEp351**

5.6kb

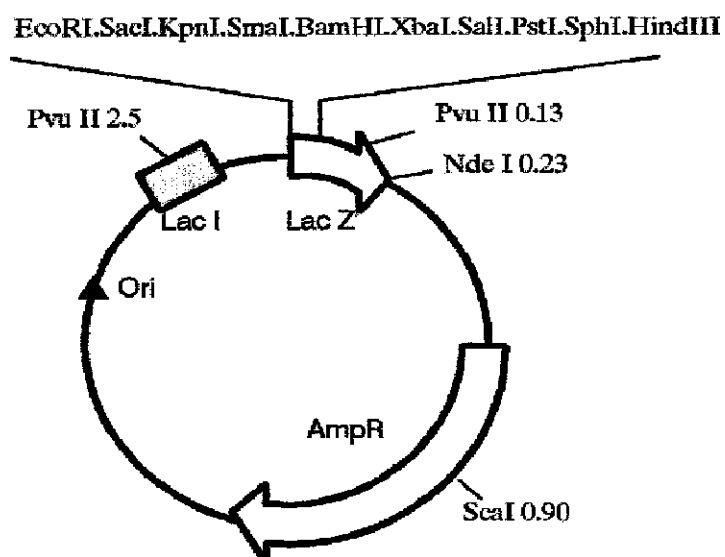
**YEp352**

5.20kb

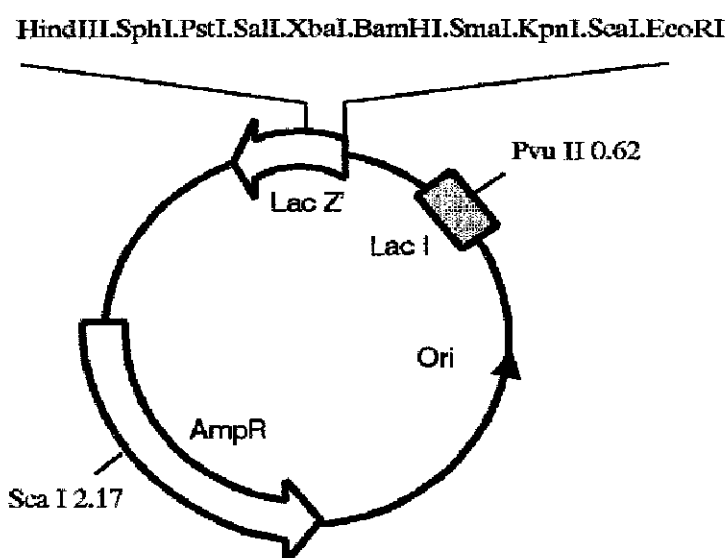
**Figura 3.1. Continuación.**

**pUC18**

2.69 kb

**pUC19**

2.69 kb

**Figura 3.1. Continuación.**

### 3.3.- MEDIOS DE CULTIVO.

#### 3.3.1. Medios de cultivo de *E. coli*.

*E. coli* fue cultivado a 37°C en medio LB (bactotripton 2%, extracto de levadura 1% y NaCl 1%, a un pH de 7.2 al que se añadía ampicilina (50µg/ml) o tetraciclina (20µg/ml) para seleccionar los transformantes por resistencia a estos antibióticos. Cuando se cultivaban vectores derivados de M13, las bacterias eran crecidas en medio H (bactotripton 1% y NaCl 0.8%).

#### 3.3.2. Medios de cultivo de *S. cerevisiae*.

Las cepas de *S. cerevisiae* se cultivaron a 30°C en medio YPD (extracto de levadura 1%, bactopectona 2% y glucosa 2%). Para la selección de mutantes de levadura resistentes a higromicina B, se añadió al medio 150µg/ml del antibiótico. Para la selección de transformantes de levadura se utilizó el medio mínimo compuesto por YNB sin aminoácidos (Difco) 0.7%, glucosa 2% o galactosa 2%, o glicerol 2% más lactato 2%. En los mutantes auxotróficos se añadió al medio adenina 40µg/ml, uracilo 40µg/ml, L-histidina 100µg/ml, L-leucina 30µg/ml, o L-threonina 200µg/ml, según cada caso. En todos los casos, los medios fueron tamponados con 50mM MES y ajustados a pH 6.0 con Tris o con 50mM ácido succínico y ajustado a pH 3.0 con Tris. Para el crecimiento de las cepas de levadura en medio sólido se añadía a los medios anteriores agar al 2%. El seguimiento del crecimiento se realizó por medida de absorbancia a 660nm en un espectrofotómetro, Spectronic-20 Bausch & Lomb.

### **3.4.- MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN CELULAR.**

Las células competentes de *E. coli* (cepas TG1, DH5 $\alpha$  y XL1Blue) se preparaban por el método descrito por Hanahan (1983). Para la transformación de células de levadura, se ha utilizado el método del acetato de litio descrito por Ito y col. (1983).

### **3.5.- MÉTODOS GENÉTICOS.**

Los cruzamientos entre cepas haploides, el aislamiento de diploides, la esporulación y posterior disección de tétradas, han sido realizadas según los métodos descritos para *S. cerevisiae* por Sherman (1986) y Sherman y Hicks (1991).

### **3.6.- PREPARACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.**

#### **3.6.1. Obtención de DNA plasmídico de *E. coli*.**

Para obtener en grandes cantidades el DNA plasmídico se purificó por centrifugación isopícnica en gradientes de ClCs. Según el método descrito en Sambrook y Maniatis (1982). Para preparaciones rápidas, se utilizó el sistema desarrollado por Quiagen, siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. La cuantificación de DNA se realizó midiendo la absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro, y comprobación mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7%.

Para obtener pequeñas cantidades de DNA plasmídico, seguimos el protocolo de Holmes y Quigley (1981).

### **3.6.2. Obtención de DNA total de levaduras.**

Para el aislamiento de DNA total de levaduras para análisis de Southern, se siguió el método descrito por Hoffman y Winston (1987).

### **3.6.3. Obtención de RNA total de levaduras.**

El RNA total de levaduras se obtuvo siguiendo el método descrito por Carlson y Botstein (1982).

### **3.6.4. Extracción de plásmidos de levadura.**

Se usó el método descrito por Rothstein (1985).

## **3.7.- TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS.**

### **3.7.1. Electroforesis de DNA.**

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa horizontales, sumergidos en tampón TBE (Tris-borato 45mM, EDTA 1mM pH8) con Bromuro de etidio a una concentración de 0.5 $\mu$ g/ml según el protocolo descrito por Sambrook y col. (1989). La concentración de agarosa fue del 0.7%, salvo en los casos en que los fragmentos de DNA tenían un tamaño inferior a 0.5Kb, que se usaba al 2%.

En la secuenciación de DNA se utilizaron geles de acrilamida al 8% (acrilamida 7.6%, bisacrilamida 0.4%, urea 6M en tampón TBE).



### **3.7.2. Electroforesis de RNA.**

Los geles se prepararon según el método descrito por Lerach y col. (1977) en tampón MOPS a pH 7.0 (MOPS 0.2M, NaAc 50mM y EDTA 10mM) que contenía agarosa al 1% y formaldehído al 1.9%. La electroforesis se realizó en el mismo tampón. Antes de ser aplicadas las muestras de RNA, se trataron con un tampón de desnaturalización (1mM formamida, 10xMOPS y 0.03mM formaldehído) y calentadas a 68°C durante 5 minutos.

### **3.7.3. Electroforesis de proteínas.**

Las distintas fracciones proteicas se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS, según el método descrito por Laemmli (1970).

## **3.8.- SECUENCIACIÓN DE DNA.**

El fragmento de 3kb (fragmento *KpnI-SalI*) que contenía el gen APA 1, se subclonó en los vectores fágicos M13mp18 y M13mp19 para permitir la lectura en ambos sentidos. El método de secuenciación utilizado fue el de terminación de la cadena con dideoxinucleótidos (Sanger y col., 1977), usando el equipo 2.0 Sequenase (U.S. Biochemical Corp), y como cebadores oligonucleótidos sintéticos. El análisis de la secuencia obtenida se realizó aplicando el paquete de programas de UWGCG (Deveraux y col., 1984).

## **3.9.- AMPLIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE PCR.**

La amplificación de fragmentos de DNA mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, se realizó según el método descrito por Taylor y col. (1989). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como

cebadores, se obtuvieron a partir de las secuencias de los genes publicadas en el EMBL/GenBank.

### **3.10.- TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.**

#### **3.10.1. Transferencia de DNA o RNA a un soporte sólido.**

La transferencia de DNA o RNA a filtros de nylon (Amersham, Hybond-N) o nitrocelulosa (Millipore) se realizó, según describe Southern (Southern, 1975), por capilaridad durante 16 horas, usando 10xSSPE (NaCl,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y EDTA pH 7.4) y fijando el DNA o RNA mediante luz ultravioleta.

#### **3.10.2. Marcaje de sondas radiactivas.**

Para el marcaje de fragmentos de DNA se utilizó [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-dCTP(3000Ci/mmol) mediante la técnica descrita por Feinberg y Vogelstein (1983), usando el "Random Primer" pd(N)<sub>8</sub> (Boehringer) como iniciador y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* para reconstruir la doble cadena de DNA desnaturalizado. Las sondas se desnaturalizaban por calentamiento a 95°C durante 3 minutos antes de su uso.

#### **3.10.3. Hibridación de sondas a DNA y RNA fijados a soportes sólidos.**

La hibridación de sondas marcadas radiactivamente a DNA o RNA fijados a soportes sólidos, se realizó siguiendo los métodos previamente descritos (Sambrook y col., 1982; Ausubel y col., 1989). Los lavados para eliminar la sonda unida inespecíficamente, se llevaron a cabo a temperatura ambiente, primero con una solución salina (1xSSPE y 0.2%SDS) a tiempos cortos (2 x 10 minutos), siguiendo a continuación un lavado de 2 horas a 68°C

con una solución de bajo contenido salino (0.1xSSPE y 0.2%SDS). Una vez secos los filtros, se expusieron a una película autorradiográfica (Curix-RP-2, Agfa) durante 3-24 horas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , usando una pantalla intensificadora.

### **3.11.- OBTENCIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES DE LEVADURA.**

La fracción de membrana plasmática de levadura se purificó a partir de extractos celulares mediante centrifugación diferencial y en gradiente de sacarosa, tal como fue descrito por Serrano (1988).

### **3.12.- VALORACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.**

#### **3.12.1. Valoración de la $\text{H}^{+}$ -ATPasa.**

Para valorar la actividad de  $\text{H}^{+}$ -ATPasa de los extractos celulares y de las membranas plasmáticas obtenidas, seguimos el método descrito por Serrano (1988).

#### **3.12.2. Determinación de proteína.**

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976), utilizando el "kit Bio-Rad protein assay" y como patrón IgG Bovina.

#### **3.12.3. Valoración de actividad $\beta$ -galactosidasa.**

Determinamos la actividad  $\beta$ -galactosidasa en extractos de levadura procedentes de cultivos crecidos hasta fase logarítmica, utilizando el método descrito por Miller (1972).

#### **3.12.4. Valoración del transporte de glucosa.**

Para estudiar el transporte de glucosa en la célula, crecimos las levaduras en medio con glucosa o galactosa hasta fase exponencial, se lavaron con agua estéril y posteriormente se incubaron en 50mM Mes-Tris tamponado a pH 6.0 a una concentración de 10mg/ml; después de 10 minutos de preincubación a 30°C, se midió el transporte de glucosa (concentración final 110mM) por el método descrito por Bisson y Fraenkel (1983).

#### **3.13.- MEDIDA DEL pH INTRACELULAR.**

El pH intracelular se midió siguiendo el protocolo descrito por Eraso y col. (1987), usando ácido benzoico marcado radiactivamente.

#### **3.14.- TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.**

##### **3.14.1. Purificación de anticuerpos.**

Los anticuerpos policlonales específicos contra la ATPasa de levaduras (Serrano y col., 1986), se purificaron por afinidad mediante el método de Monk y col. (1991).

##### **3.14.2. Tratamiento de proteínas transferidas a soporte sólido.**

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de acrilamida, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa según los métodos descritos por Towbin y col. (1979) y Dunn (1986).

---

Las membranas con las proteínas fijadas se trataron con los anticuerpos específicos purificados por afinidad y se revelaron con un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (BioRad), tal y como describió Blake y Col. (1984).

### **3.15.- REACTIVOS.**

Todos los reactivos para las valoraciones enzimáticas o de metabolitos, procedieron de Merck, Boehringer Mannheim o Sigma.

Los medios de cultivo se prepararon siempre con reactivos de Difco, a excepción de los azúcares que procedieron de Merck (glucosa) o Sigma (galactosa) y los suplementos de aminoácidos que fueron de Sigma. Los reactivos para la transformación de levadura fueron de Merck.

Las endonucleasas de restricción y las enzimas utilizadas en la manipulación de ácidos nucleicos procedieron de Boehringer Mannheim.

Los compuestos con isótopos radiactivos se adquirieron a Amersham.

## **CAPITULO 4.- RESULTADOS.**

#### **4.1.- AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES CON BAJOS NIVELES DE ACTIVIDAD $H^+$ -ATPasa.**

Nuestro trabajo se inició aislando mutantes que tuviesen bajos niveles de actividad de la  $H^+$ -ATPasa. Estos mutantes se obtuvieron mediante una doble selección, resistencia a higromicina B y, posteriormente, por sensibilidad de crecimiento a pH ácido. La higromicina B es un antibiótico aminoglicósido cargado positivamente, que inhibe la síntesis de proteínas (Perlin D.S., Brown C.L., y Haber J.E.; 1988) y que entra en la célula aprovechando el potencial de membrana que es creado mayoritariamente por la  $H^+$ -ATPasa (Slayman, 1987; Borst-Pauwels, 1981; Vallejo y Serrano, 1989). Mutantes con bajos niveles de actividad de  $H^+$ -ATPasa presentan menor potencial de membrana, por lo tanto, disminuye la entrada del antibiótico y la levadura resiste a una mayor dosis del mismo. La  $H^+$ -ATPasa ejerce un estricto control sobre el pH intracelular de la levadura, lo que a su vez regula la velocidad de crecimiento (Goffeau y Slayman, 1981; Goffeau y Green, 1990; Serrano, 1991; Gaber, 1992). Mutantes con bajos niveles de actividad de la  $H^+$ -ATPasa son incapaces de mantener un pH intracelular óptimo, por lo que cuando el medio se acidifica, bien como resultado del crecimiento, o bien de un modo artificial, dejan de crecer. Para diferenciar entre los mutantes resistentes a higromicina B aquéllos que estaban afectados en la actividad de la  $H^+$ -ATPasa se utilizó como medio selectivo el crecimiento en medio ácido. Mutantes con bajos niveles de actividad  $H^+$ -ATPasa serán incapaces de crecer en este medio, mientras que los mutantes debidos a alteraciones en la proteína diana del antibiótico sí pueden crecer en dicho medio.

Se aislaron cuatrocientos mutantes independientes resistentes a higromicina B, de los cuales, treinta y cuatro mostraban un crecimiento sensible a pH ácido. Además, se comprobó que todos los mutantes que presentaban el fenotipo de sensibilidad del crecimiento a pH ácido, mostraban niveles de actividad  $H^+$ -ATPasa sensiblemente inferiores a los de la levadura parental.

A continuación, se procedió al análisis genético de los mutantes aislados. En primer lugar, se determinó si las mutaciones aisladas eran alélicas al gen estructural de la  $H^+$ -ATPasa (PMA1). Para ello, se transformaron los mutantes con el plásmido pIB 4, un plásmido centromérico (pSB32) con un fragmento de DNA de 5 kb que contiene el gen estructural de la  $H^+$ -ATPasa. En siete de los mutantes se observó que el fenotipo de crecimiento sensible a pH ácido se suprimía tras la transformación, lo que indicaba que dichos mutantes llevaban mutaciones que afectaban al gen PMA1.

Los restantes veintisiete mutantes, se cruzaron con la cepa silvestre A10700B, se aislaron diploides heterocigotos provenientes de los cruces entre las cepas mutantes y la cepa silvestre. Todos los diploides mostraban un crecimiento en medio a pH  $\approx 3.0$  indistinguible del crecimiento de un diploide homocigótico silvestre, indicando que las mutaciones responsables del fenotipo de crecimiento sensible a pH ácido eran de carácter recesivo.

A continuación, los diploides se esporularon y se sometieron a un análisis de tétradas, donde se analizó la segregación del fenotipo de sensibilidad de crecimiento a pH ácido en las esporas resultantes. En cada cruce, se analizaron entre cinco y siete ascas completas, y en todas ellas, el fenotipo estudiado segregó en una proporción  $2^+:2^-$ , sugiriendo que las mutaciones residían en un gen nuclear.

Para determinar, además, si los fenotipos de sensibilidad de crecimiento a pH ácido y bajos niveles de actividad  $H^+$ -ATPasa eran debidos a la misma mutación, se estudió la cosegregación de ambos fenotipos. Para ello, se aislaron membranas plasmáticas de las esporas de dos tétradas de cada cruce y se valoró la actividad  $H^+$ -ATPasa a las mismas. En todos los casos se observó cosegregación de ambos fenotipos, indicando que el fenotipo de sensibilidad del crecimiento a pH ácido y los bajos niveles de actividad  $H^+$ -ATPasa eran, probablemente, debidos a la misma mutación.



A continuación, se procedió a determinar, el número de grupos de complementación representado por los veintisiete mutantes. Para ello, en primer lugar, se realizaron cruces entre los distintos mutantes; en los diploides aislados de cada cruce se analizó si las mutaciones presentes en los mismos complementaban. Los resultados de estos cruces se muestran en la tabla 4.1, y sugieren que los veintisiete mutantes forman siete grupos de complementación.

**Tabla 4.1. Tabla de complementación de los distintos mutantes apa.** Se cruzaron los distintos mutantes y se analizó la complementación de los diploides resultantes. En la parte inferior, resultado de los distintos cruces y simplificación en siete grupos de complementación.

Mutantes →	H1	H2	H5	H10	H11	H12	H13	H15	H19	H20	H37	H38	H49	H52	H62	H63	H69	H70	H72	H78	H79	H85	H104	H105	H109	H111	H114
H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H13	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H19	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H20	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H37	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H38	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H49	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H52	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H62	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H63	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H69	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H70	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H72	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H78	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H79	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H85	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H104	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H105	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H109	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H111	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H114	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

#### GRUPOS DE COMPLEMENTACION

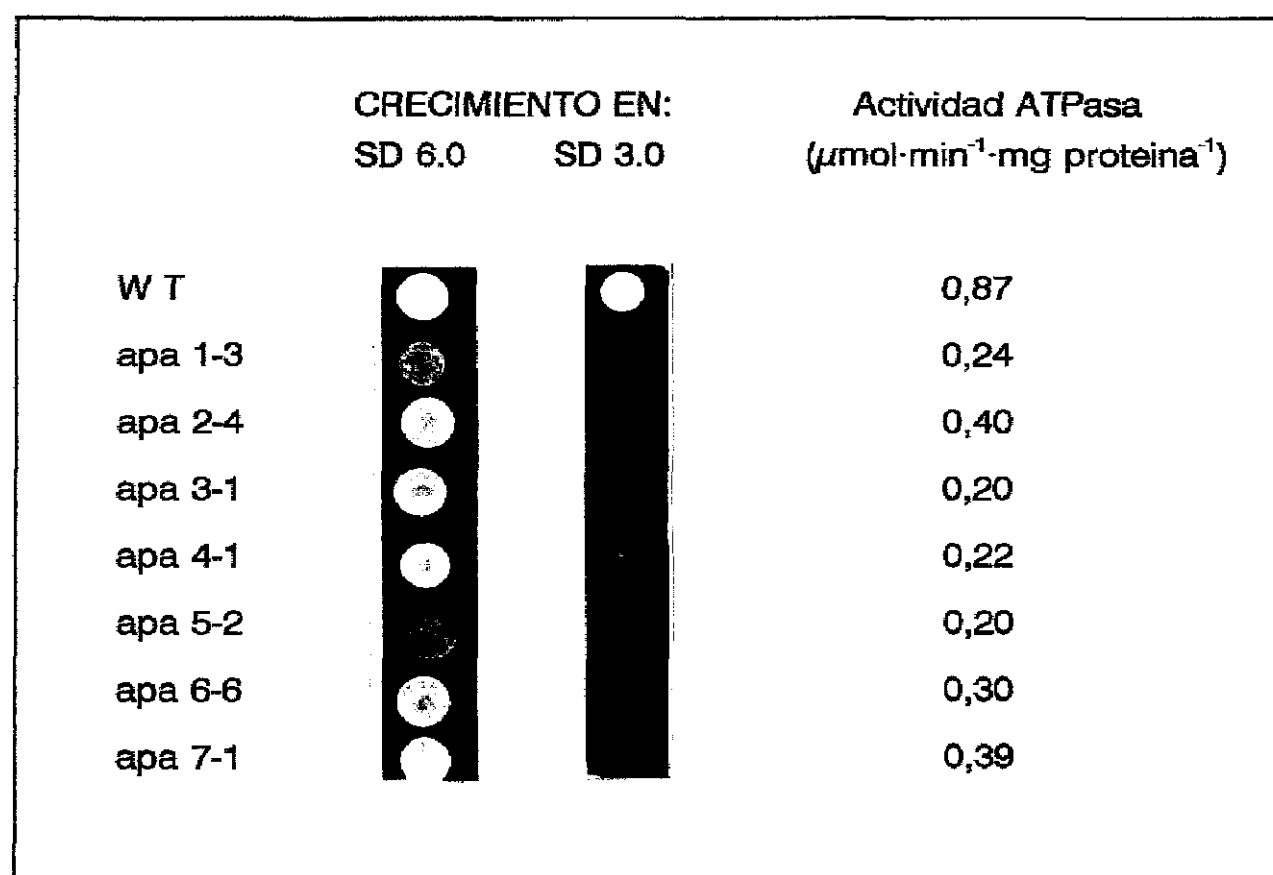
GRUPO	MUTANTES
APA1	H1, H2, H5, H10, H11, H12, H13, H15
APA2	H19, H20, H38, H52, H85, H111
APA3	H37, H62, H63, H69, H78, H105
APA4	H49, H79
APA5	H70, H104
APA6	H72, H107
APA7	H114

En segundo lugar, y para descartar posible complementación intragénica, se procedió a realizar el análisis de tétradas de diploides heterocigotos provenientes de los cruces entre mutantes representativos de cada grupo de complementación. En cada cruce se analiza la segregación del fenotipo de sensibilidad de crecimiento a pH ácido. En cada cruce se analizaron entre 4 y 14 tétradas, que mostraron una segregación  $2^-:2^+$ ,  $3^-:1^+$  y  $4^-:0^+$  (tabla 4.2) en una frecuencia que sugiere que las mutaciones no eran alélicas.

**Tabla 4.2. Análisis de tétradas de diploides heterocigotos provenientes de los cruces entre mutantes representativos de cada grupo de complementación.**

CRUCES ENTRE MUTANTES	Número de Tétradas		
	$2^-:2^+$	$1^-:3^+$	$0^-:4^+$
H5 x H19	1	5	3
H5 x H72	1	5	0
H5 x H78	0	3	1
H5 x H79	1	4	2
H5 x H104	1	7	1
H5 x H114	1	5	3
H19 x H72	1	6	1
H19 x H78	1	6	1
H19 x H79	1	11	2
H19 x H104	1	5	1
H19 x H114	2	9	1
H72 x H78	1	9	1
H72 x H79	1	7	1
H72 x H104	1	8	2
H72 x H114	1	8	2
H78 x H79	2	9	3
H78 x H104	2	8	1
H78 x H114	2	10	3
H79 x H104	2	7	2
H79 x H114	1	6	1
H104 x H114	2	8	1

Todos estos resultados indican que los veintisiete alelos mutantes aislados, pertenecen a siete genes distintos, que llamamos de un modo arbitrario APA1-APA7. El grupo de complementación *apa1*, estaba constituido por ocho mutantes; el *apa2* y el *apa3* estaban constituidos por seis mutantes cada uno; el *apa4*, *apa5* y *apa6* contenían cada uno dos mutantes; y el *apa7* contenía sólo un mutante. La Figura 4.1 muestra el fenotipo y los niveles de actividad  $H^+$ -ATPasa de mutantes representativos de cada grupo de complementación.



**Figura 4.1. Fenotipo y nivel de actividad  $H^+$ -ATPasa de cada grupo de complementación.** Se realizó el ensayo a la gota con las células sobre placas que contenían medio con glucosa tamponado a pH 6.0 ó 3.0 e incubadas a 30°C durante dos días. La actividad ATPasa se midió en membranas plasmáticas purificadas de células crecidas en glucosa. Los valores son la media de dos experimentos.

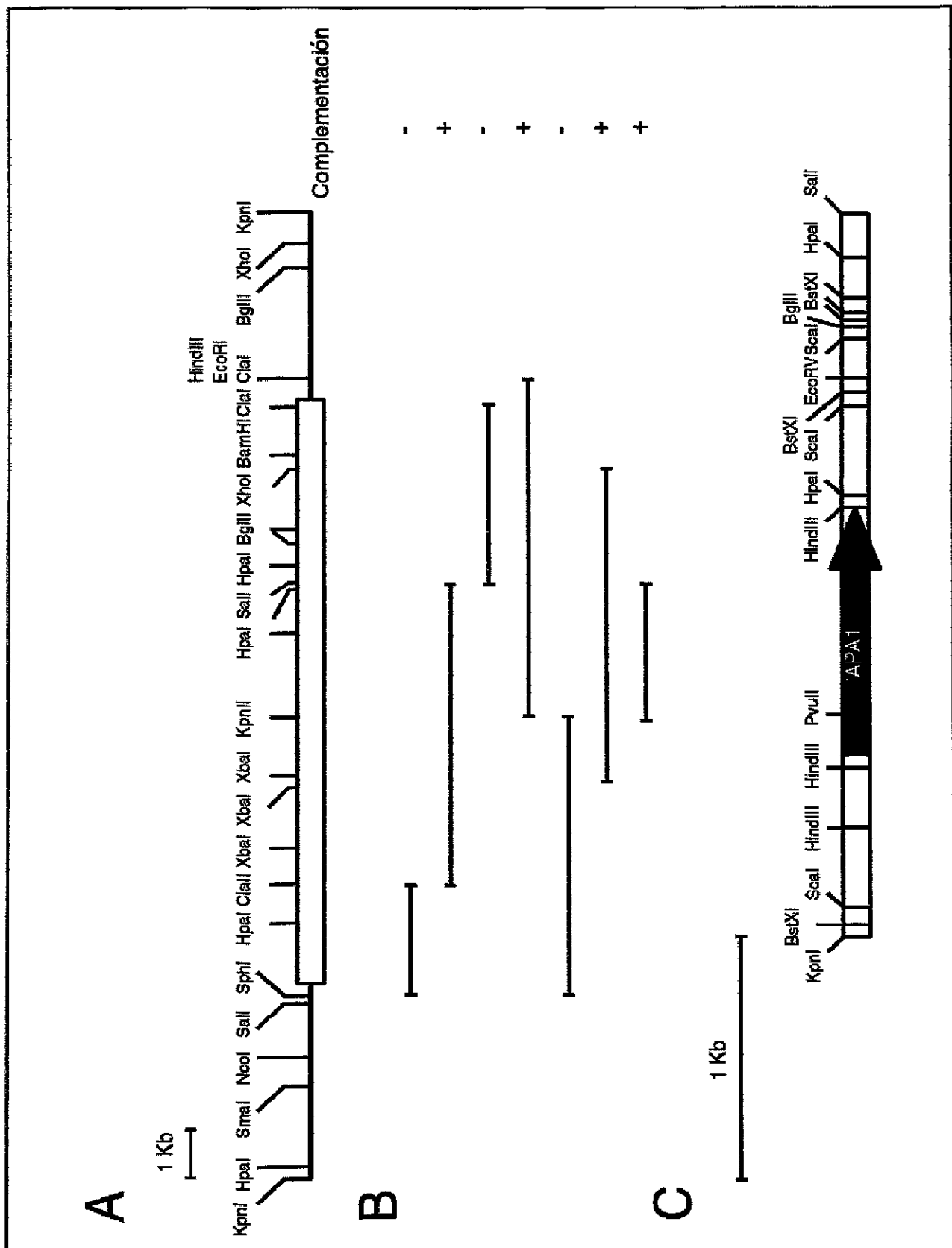
Seguidamente se procedió a caracterizar con más detalle el locus APA1. Primeramente procedimos al aislamiento y secuenciación del gen.

#### 4.2.- AISLAMIENTO DEL GEN APA1.

El gen APA1 se aisló de una genoteca de DNA genómico de levadura en el vector YCp50 (Rose y col., 1987), mediante complementación del fenotipo de crecimiento sensible a pH ácido. Se aislaron seis transformantes capaces de crecer en medio a pH  $\approx$  3.0. Estos seis transformantes mostraban, además, niveles de actividad H<sup>+</sup>-ATPasa similares a los de la estirpe silvestre. Para comprobar que la supresión del fenotipo de crecimiento sensible a pH ácido y la restauración de los niveles de actividad H<sup>+</sup>-ATPasa eran debidos a la presencia del plásmido, se procedió a inducir la pérdida del mismo y a estudiar la cosegregación de los fenotipos conferidos por el plásmido. En todos los casos (cinco colonias aisladas de cada transformante) se observó cosegregación de la prototrofia para uracilo, crecimiento a pH ácido, y niveles normales de actividad H<sup>+</sup>-ATPasa.

De cada levadura transformante, se recuperó el plásmido, se amplificó en *E. coli*, y se procedió a realizar un análisis de restricción de los plásmidos recuperados. Este análisis mostró que todos los plásmidos llevaban el mismo inserto, de aproximadamente 12 kb. A este plásmido se le denominó pMG100 y su mapa de restricción se muestra en la figura 4.2.A.

A continuación se procedió a delimitar la zona de inserto, que complementaba a la mutación *apa1*, mediante subclonaje de distintos fragmentos de restricción. La estrategia seguida se muestra en la figura 4.2.B. Tras este análisis, la región que complementaba a la mutación *apa1*, se redujo a un fragmento de aproximadamente 3 kb acotado por los sitios de restricción *Kpn I* -*Sal I*. La figura 4.2.C. muestra el mapa de restricción de dicho fragmento.



**Figura 4.2. A:** Mapa de restricción del plásmido pMG100 conteniendo el gen APA1. La línea negra indica la secuencia del vector y el recuadro indica la secuencia de levadura. **B:** Subclonaje del plásmido pMG100. **C:** Mapa de restricción del fragmento de 3Kb *KpnI-SalI*.

#### 4.3.- SECUENCIACIÓN DEL GEN APA1.

Como hemos visto anteriormente, se determinó una región de aproximadamente 3 kb acotada por los sitios de restricción *Kpn I* - *Sal I*, que complementaba la mutación *apa1-3*.

A continuación se procedió a subclonar el fragmento de aproximadamente 3kb en los vectores fágicos M13mp 18 y M13mp 19 para permitir la lectura de la secuencia de ambas cadenas de DNA y, de esta forma, poder secuenciar el gen APA1.

El método elegido para secuenciar el fragmento, fue el de terminación de la cadena con dideoxinucleótidos desarrollado por Sanger en 1977. Fueron utilizados como cebadores de la síntesis, oligonucleótidos sintéticos cuya secuencia fue deducida a partir de las zonas previamente leídas. El rango medio de lectura fue de unos trescientos pares de bases. De esta manera se fue completando la secuencia de nucleótidos de ambas cadenas del fragmento.

Una vez secuenciado el fragmento, se encontró una única fase de lectura abierta que contenía 1.035 pares de bases, cuya posición en el fragmento de 3 kb *KpnI-SalI*, se puede observar en la figura 4.2.

La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos, se muestra en la figura 4.3.

-750	GGTACCCGTACATCTTGGCATTGCGACAGCAACTTCATTCGAGATCAGAAAGATTGAACCTGGCGAATTAAATTCGCTTCGCTCTGCTGATA	
-660	AGATTGCACTTCTACAAACAAGTACTCAGGAAATCCTGTACTGCTACGGGATTATCGCGGTATGATACAGTTGCGCTCGTTGATTTCTG	
-570	GGGTTAAGATAGCAACGTATATGACATTCCTTATTTTGTAGAAATAAAGCATAACTAAAGTTGTAAAGGAGCAGAAATATGAATAAT	
-480	AAACATTGATACATAGTGGAAACGACTAAATAATAATTTTATATATAAATAATGATAATTCACCGTAGAGAGGCAATTTGTATGCAAAAT	
-390	CATGATACCCAGAAAAAAGCGCAAAATTTTCTTCCCAAGCTTCGAATTTTATTCCGTCCACAAAGTGAAAAATTTTCAGAAAAAT	
-300	TTCCAGACTGTGAATAACAAAGGTGGCTTACGCAATTGGCTTGTCTTTTTCCTTTTTCACAGGTTCTTAGTAATAATTTGTATATAAA	
-210	TATTTATCTGAGTCTTCTGTTTGTGTTAGCTTGTGTTGAAGTTTATTTAACTTATTACCCATTAGGTAAGTGTATTTTCGCA	
-120	TATCTGGTGTCTTTTAAATTTGGTCATTGATTGGTTTTCGACAGCTCTTCACCTCGCTTCAAGCTTACTTCTAGTTTATTTATCGGCTTT	
-30	TTCCGTTTGTGTTACGAAACATAAAGCTCATGAACTACTACACATCTACTGTTATAGCAGCAGTTTCCGACCAAGTTCCAGTCTTTGAAC	
	M N T T T S T V I A A V A D Q P Q S L N	20
61	TCTCTCTCTCATGTTTCTTGAAGCTTCATGTCTCTTCCATTGATAACCCATTGCTATTGAAATTAAGGCCAATTTTCTCCAAAGTGT	
	S S S S C F L K V H V P S I D N P F G I E L W P I P S K V F	50
151	CAATACATTGCTGCTATCCAGCTGAGCAATTCGAGTTTATTCACAATAAGACTTCTTCCGCTAACCGGTATCAGCTGTAGTATTAT	
	E Y F S G Y P A E Q F E F I H N E F L A N G Y H A V S I I	80
241	ATCGTTTATTACATTATTATCTTTGGTGGCCAGCTATCTTACCGGCTTGAACGCTCTCCATTAAAGTTAAATTCCTTTGAGAGATA	
	I V Y Y I I I F S G Q A I L R A L N A S P L K F K L L F E I	110
331	CACAACITGTTTTGACATTCATTTCTCTAGTTTAAAGGTTGCTGAGCTAGAACASTTGGTTCCTATGCTTTATCAGACAGGCTTATTC	
	H N L F L F S I S L V L W L L M L E Q L V P M V Y H N G L F	140
421	TGGCTATCTGCTCTAGGAAAGCCTTCGCAACCAAAATTAAGTTACTCTTACTATTGAACTATTGACCAAAATTCGTAAGATGATTGAC	
	W S I C S K E A P A P K L V P L Y Y L N Y L T K F V E L I D	170
511	ACTGCTTTTACTTTTGAAGAAAGAGTTATGTTTTCGACACTTACCAATCACGGTCCACCGCTTTGTTGCTCTACTCAATTA	
	T V F L V L R R K K L L F L H F Y H N G A T A L L C Y T Q L	200
601	ATGCTCTCTCTCTCTGTAAGCGGTAGTTATCTCTAGTAAAGTGGGCTTCACGCTATCAGTACTCTGCTACTCTCTGACTTCAAGT	
	I G R T S V E R V V I L L N L G V H V I M Y F Y Y F L S S C	230
691	GGTATTAGAGTTTGGTGGAAAGCAATCGCTACATGAGATTCACAAATATTCATTTTGAATGAGCTTGGTATTGTTTACTTTGCTTACCTAT	
	G I R V W W K Q W V T E F Q I I Q F L I D L V F V Y F A T Y	260
781	ACATTCTATGCTCACAATACTTGGACGCTATTTTACCAACAGGCTACTGTTATGCTACTCAGGCTGCTGCTGCTTATGGGTATTTG	
	T P Y A H K Y L D G I L P N K G T C Y G T Q A A A A Y G Y L	290
871	ATCTTAACATCTTATTTGCTTTTGTATTATTCCTTCTACATCCAACTTACAGAAAGGCTGGTAAAGAGACAGTCAAGAGGAAATCTGAA	
	I L T S Y L L L F I S F Y I Q S Y K K G G E K T V K K E S E	320
961	GTTCCGGCTCTGCTGCAACCGGCTCTTCTACGGGTGTCAGACCTCTACACCAAGGCTCTCTCCAGGAAAGCTTAAATAGGAAGCGAG	
	V S G S V A S G S F Y G V K T S N T K V S S R K A *	345
1051	AAATTTTGACAGCGAATGAAAAAGAAAAAATFAAATGTAAACATTTTCTTTATATTAAATATGTACGATAAATGAATCTTATTATAGA	
1141	AATGATAGATTATTGGCTTGGCTGTTTTTCCCAATTTTGATTAATCATTTCTCTTAGCTGCCCCAAGAATTGCACGCTTACAGTGAGGAGTAG	
1231	TGATACATTACAAATATAAAATAAAATTTATATATAGCAGCTAAAAATTTAAACCAACAGACCAAGTTCCCTTGTATGTCCTATGGAAGAT	
1321	ACTGACTTGCAGTTTGTAAAGTGTCCAGTCTTAATCCACTTCTAGTTGCCACGAATTAATGATTAATTTAATTTAATTAATCTCTTGA	
1411	GTTAAATCGGGAATGACTCTGGGAATGAGCAATTTAAAAATGAGTACTCTCCCTAATGGAGGAAGATGACTGACATTGCTATTCCTGAA	
1501	CAAAATTTGATATCTCGGCCAGATCATATCTAAGTATTGGGACCGGACCGCTTACACAGGAACATGGATATCAGTAATCTTCAAT	
1591	GAACTTCATTGGTTGTTCTAGCTCTCCAAATATAGAGTCTCTGTTATTATTGCTTCTTGAACCGGCCACATCTCTAATGAATTTGCTT	
1681	TGTTCACAATGACAGCTCTGAAGATATGGTACGATGGAGTTTACTGTAATCAAGTACTATATAGTCTCTTCAATGATTGTTAA	
1771	AAAGATAGATCTATTTCCCTTGATATGTTAGATCCGATAAATGATGGATCGCTAAGAGAACCAATGATAGGTTATTATTGCTATTTCTG	
1861	TGGTGTGTTCTCCGTAATACAGAAATTTCTCCACCGTAGGATCTATATCTCTTGAAGCGGGCGTATTGATTCAGTGGTGTCTGCT	
1951	TGTCGTTATCATGTTCTTATCATTTATTTGCTGCTGTTGTTGCTGCTCTCTATGCTGATGTTGTTCTGCTGATTAATCAAGTGTGAATTTCA	
2041	TGTTGCTATGATTTGGAATATTATGACTGTTGTTAAAGTTGCTTATGTTGTAATTCAAAACTTTTCAATAAAGTGTGAATTTGATG	
2131	TAGAAAGTTTGTGAC	

Figura 4.3. Secuencia del fragmento de 3Kb *KpnI* - *Sall*, mostrando la secuencia de aminoácidos del gen APA1 deducida a partir de la secuencia de bases.

#### **4.4.- ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE APA1.**

##### **4.4.1. Análisis de las regiones 5' y 3' no codificadas.**

La secuencia de las regiones 5' y 3' no codificadas se observa en la figura 4.4. La región promotora de un gen de levaduras está constituida por tres elementos fundamentales: la caja TATA (Dobson y col., 1982), el sitio de iniciación de la transcripción y elementos reguladores, tanto positivos como negativos (Bitter y col., 1991; Chambers y col., 1988). En la región 5' encontramos los siguientes elementos: una caja TATA en la posición -217, los posibles sitios de iniciación de la transcripción en las posiciones -7 y -81 y cuya secuencia es del tipo RRYRR; una caja UAS<sub>RPG</sub> en la posición -747; y dos motivos CTTCC en las posiciones -357 y -546. La caja UAS<sub>RPG</sub> y las secuencias CTTCC se han observado en la región reguladora de muchos genes implicados en glicolisis y en genes de componentes de la maquinaria de traducción de proteína (Huet y col., 1985; Lue y Kornberg, 1987). La caja UAS<sub>RPG</sub> es el sitio de unión en el DNA para la proteína multifuncional TUF/RAP1/GRF1 y las regiones CTTCC son los sitios de unión de la proteína GCR1 (Baker, 1991; Huie y col., 1992). En los genes en que se presentan ambas secuencias, la proteína GCR1 forma un complejo junto con la proteína TUF/RAP1/GRF1 para activar la transcripción (Tornow y col., 1993). En la región 3' no codificadora, hemos detectado una señal de poliadenilación AATAAA a 211 pares de bases tras el codón de terminación. En las posiciones 1.260, 1.300 y 1.329 hay una secuencia TAG....TATGT...TTT que se ajusta perfectamente a la secuencia consenso para la terminación de la transcripción en levaduras (Zaret y Sherman, 1982).

##### **4.4.2. Análisis de la región codificada.**

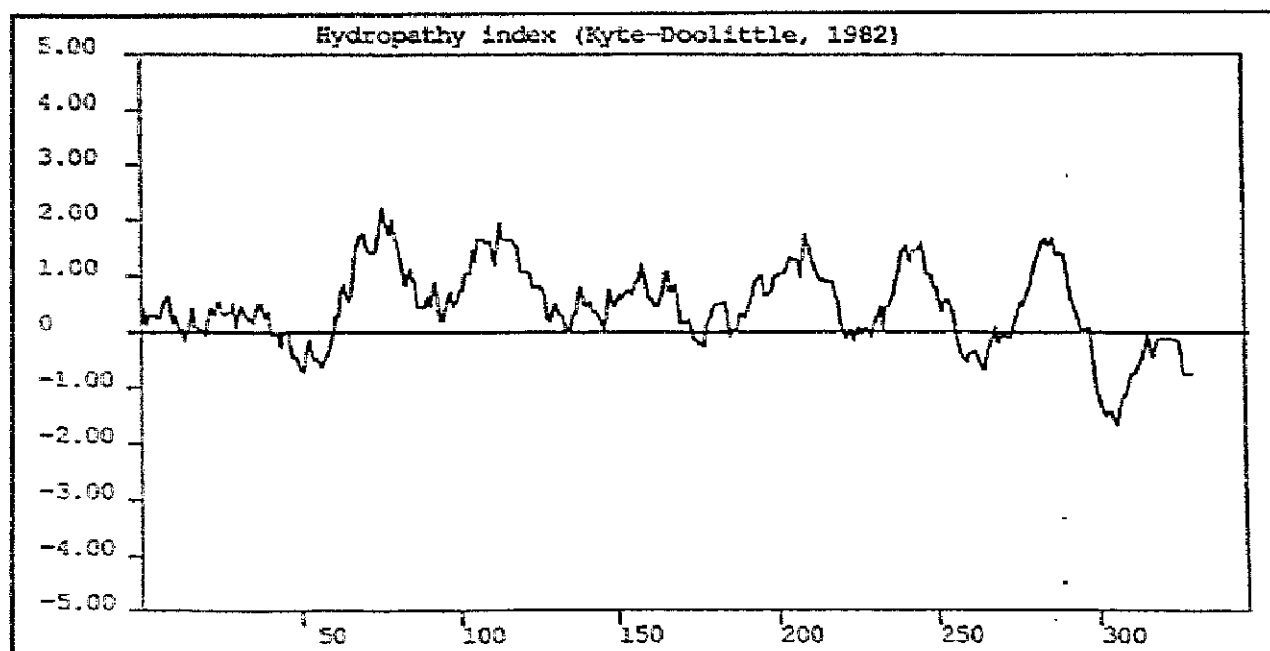
La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos de la región codificada, corresponde a una proteína de 345 aminoácidos, con una masa molecular estimada de 39.5 kda.



-750 GGTACCCGTACATCTTGGCATTTCGACAGCAACTTCATTGAGATCA  
 -705 GAAAGATTGAAACTGGCGAATTAATTCGTTGCGTCCTTGCTGATA  
 -660 AGATTTCGACTTCTACAAACAAGTACTCAAGAAATCCTGTACTGCT  
 -615 ACGAGGATTATCGCGGGTATGATACAGTTGCGTCGTTGATTTCTG  
 -570 GGGTAAAGATAGCAACGTATATGACTTCCTTATTTTCTTTAGAAT  
 -525 AAAAAGCATAACTAAAGTTGTAAAAGGAGCAGAATTATGAATAAT  
 -480 AAACATTGATACATAGTGGAACGACTAAATAATAATTTTATAA  
 -435 TATAAATAATGATAATTCACCGTAGAGAGGGATTTGTATGCAAAT  
 -390 CATGATACCGAGAAAAAAAACGCGAAATTTTTCTTCCCAAAGCT  
 -345 TCGAATTTTTATTCCGTCACAAAGTGAAAAATTTTCAGAAAATT  
 -300 TTCCAGACTGTGAATAAACAAAAGGTTGGCTTACGCATTTGGCTT  
 -255 GTCTTTTTTTTTTTTTCACAGGTTCTTAGTAAATAATTGTATAAAA  
 -210 TATTTATCTGGAGTCTTCTGTTTGTTGTTTAGCCTTGTTTGAAGT  
 -165 TTTATTTAACTTATTACCCAGTTAGGTACTGTGTATTTTCCGCA  
 -120 TATCTGGTGTCTTTTTTAATTTGGTCATTGATTGGTTTTTTGACAGC  
 -75 TCTTCACTCGCTTCAAGCTTACTTCTAGTTTATTTATTCGGCTTT  
 -30 TTTCCGTTTGTTTACGAAACATAAACAGTCREG. CODIFICADA  
 +1063 ATAGGAAGCGAGAATTTTTGACAGCGAATGAAAAAGAAAAAAATT  
 +1108 AAATGTTAACATTTTCTTTATATTAAATATGTACGATAAATGAAA  
 +1153 TCTTATTATAGAAATGATAGATTATTGGCTTGGTGTTTTTCCCAT  
 +1198 TTTGATTAAATCATTTCTTAGCTGCCCAAAGAATTGCACGCTTAC  
 +1243 AGTGAGGAGTAGTGATACATTACAATTATAAAATATAAATTATATA  
 +1288 TAGCAGCTAAAATTTAAAACAAACAGACAAAGTTCCTTTGTATGT  
 +1333 CCTATGGAAGATACTGACTTGACAGTTTGTAAGTGTCAGTCGTA  
 +1378 ATCCACTTTAGTTGCCACGAATTATCATTGAATAATTTAATTTTA  
ATAATCTCTTGAGTTAAATCGGGATGTACTCTGGGAATGAGCATT  
TAAAAATGAGTACTCTCCCTAATGGAGGAAGATGACTGACATTG  
CATTATCTTGAACAAAATTGTAATATCGGCCAGATCATATCTAA  
GATTTGGGACCAGAACGCGTTACACACAGGAACATGGATATCAAG  
 +1558 TAACTCTTCAATGAAGTTCATTGGTTGTTCTAGCTCTCCAATAAT  
AGAGTCCTCTGTTATTATTGTCTTCTTGAAACGCGCACATCTCTA  
ATGAAATTGCTTTGTTTACAATGACGACCTGTAAGATATGGGTAC  
GATGGATGGAGTTTACTGTACTCAAGTACTATATAAGTCCTCTTG  
AATGATTTGTAAAAAGATAGATCTATTTCTTTGATATGGTAGAG  
 +1838 TCCGATAAATGATGGATCGCTAAGAGAACCAAATGATAGGTTATT  
ATTGCTATTCTGTGGTTGTTGTTCCGGTAATACAGAATTTTCTCC  
ACCAGTAGGATCTATATCTATTCTTGATGCGGGCGTATTTGATTC  
GAGTGGTGTCTGTTGTCGTTATCATGTTTCGTTATCATTATTGTCGC  
TGTTGTTGCCGCTTCTATTGTTGATGTTGTTTCGTCTGATTATCAG  
 +2018 TGTGAATGTTTCATGTTGCTATGATTGGAAGTATTATGACTGTTGT  
TAACGTTGCCTATTGTGTGTAAATTCAAAAACCTTTTCAATAAAC  
TGAAATTGATGTAGAAAGTTTGTTCGAC.

Figura 4.4. Secuencias de las regiones 5' y 3' no codificadas. Subrayados los motivos relevantes mencionados en el texto.

El índice de frecuencia de codones (Bennetzen y Hall, 1982) es de 0.47, lo que puede indicar que el gen APA1 presenta un bajo nivel de expresión (Sharp y Cowe, 1991). El análisis de hidrofobicidad de la proteína deducida a partir de la secuencia, se realizó según el método de Kyte y Doolittle (1982), y se observa en la figura 4.5.A. El perfil de hidrofobicidad sugiere que APA1 es una proteína de membrana con seis fragmentos que pueden ser considerados como fragmentos transmembrana, aunque como se observa en la figura 4.5.A. el hipotético dominio 3 no está tan claro como los otros cinco, la posible localización de los mismos en la proteína se muestra en la figura 4.5.B.



**Figura 4.5.A. Análisis de hidrofobicidad de la proteína Apa1.** La curva es el promedio de residuos hidrofóbicos obtenida mediante el método de Kyte y Doolittle con una ventana de lectura de 21 residuos.

**Figura 4.5.B. Posible localización de los fragmentos transmembrana en la proteína Apa1.** Los distintos fragmentos se encuentran subrayados.

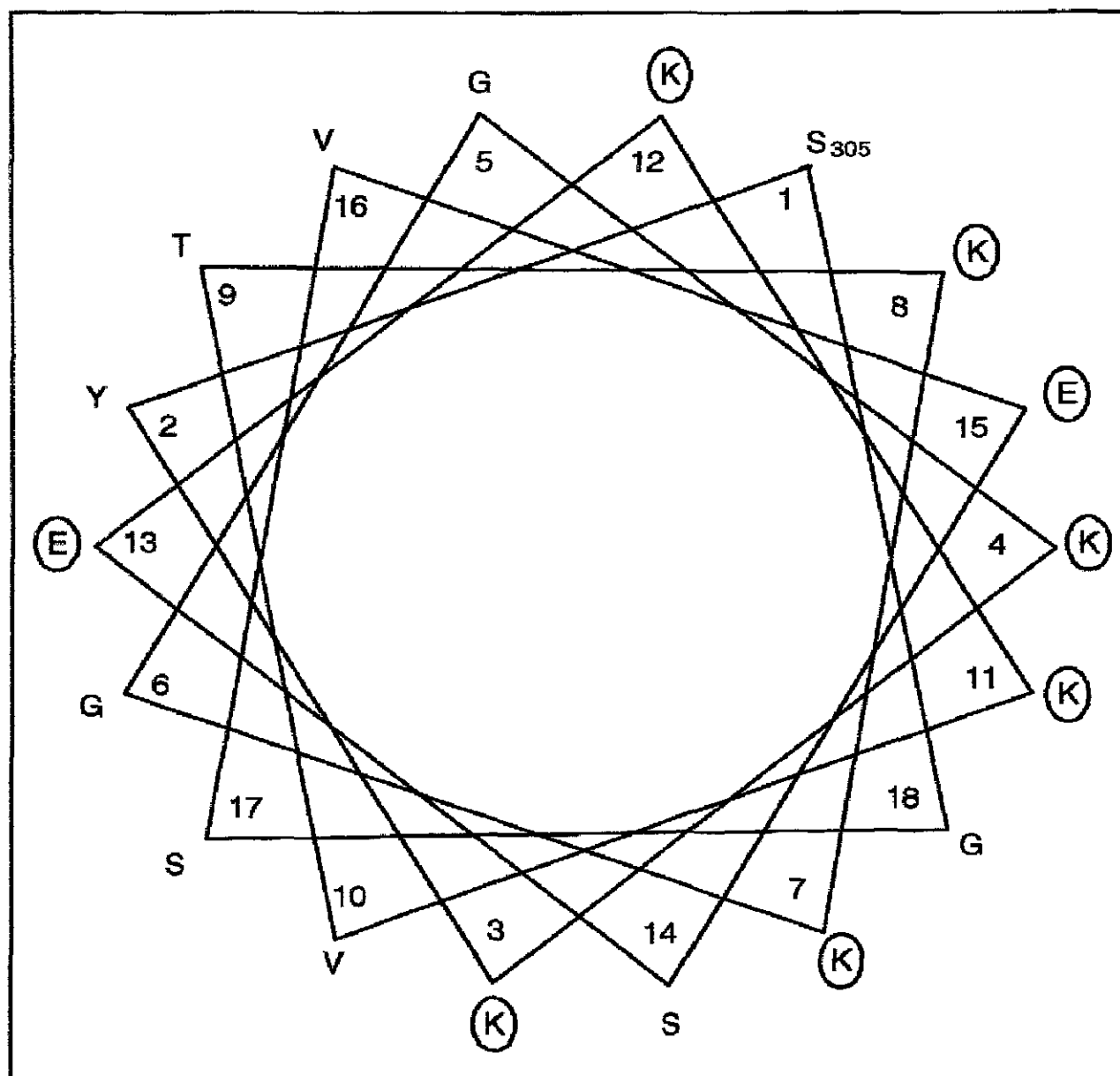
1	M	N	T	T	T	S	T	V	I	A	A	V	A	D	Q	F	Q	S	L	N	S	S
23	S	S	C	F	L	K	V	H	V	P	S	I	D	N	P	F	G	I	E	L	W	P
45	I	F	S	K	V	F	E	Y	F	S	G	Y	P	A	E	Q	F	E	F	I	H	N
67	K	T	F	L	A	N	G	Y	H	A	V	S	I	I	I	V	Y	Y	I	I	I	F
89	G	G	Q	A	I	L	R	A	L	N	A	S	P	L	K	F	K	L	L	F	E	I
111	H	N	L	F	L	T	S	I	S	L	V	L	W	L	L	M	L	E	Q	L	V	P
133	M	V	Y	H	N	G	L	F	W	S	I	C	S	K	E	A	F	A	P	K	L	V
155	T	L	Y	L	N	Y	L	T	K	F	V	E	L	I	D	T	V	F	L	V	L	
177	R	R	K	K	L	L	F	L	H	T	Y	H	H	G	A	T	A	L	L	C	Y	T
199	Q	L	I	G	R	T	S	V	E	R	V	V	I	L	N	L	G	V	H	V	I	
221	M	Y	W	Y	F	L	S	S	C	G	I	R	V	W	W	K	Q	W	V	T	R	
243	F	Q	I	I	Q	F	L	I	D	L	V	F	V	Y	F	A	T	Y	T	F	Y	A
265	H	K	Y	L	D	G	I	L	P	N	K	G	T	C	Y	G	T	Q	A	A	A	A
287	Y	G	Y	L	I	L	T	S	Y	L	L	L	F	I	S	F	Y	I	Q	S	Y	K
309	K	G	G	K	K	T	V	K	K	E	S	E	V	S	G	S	V	A	S	G	S	F
331	Y	G	V	K	T	S	N	T	K	V	S	S	R	K	A							

La proteína presenta tres sitios de N-glicosilación en las posiciones 2, 20 y 66 (figura 4.6.), y en el segmento transmembrana 2, empezando en el aminoácido 106, un motivo denominado cremallera de leucina (figura 4.6.). Este motivo se ha encontrado en proteínas que forman dímeros, por lo que su presencia en la proteína Apa1 puede indicar que en la membrana se encuentra formando dímeros.

1	M	N	T	T	T	S	T	V	I	A	A	V	A	D	Q	F	Q	S	L	N	S	S
23	S	S	C	F	L	K	V	H	V	P	S	I	D	N	P	F	G	I	E	L	W	P
45	I	F	S	K	V	F	E	Y	F	S	G	Y	P	A	E	Q	F	E	F	I	H	N
67	K	T	F	L	A	N	G	Y	H	A	V	S	I	I	I	V	Y	Y	I	I	I	F
89	G	G	Q	A	I	L	R	A	L	N	A	S	P	L	K	F	K	L	L	F	E	I
111	H	N	L	F	L	T	S	I	S	L	V	L	W	L	L	M	L	E	Q	L	V	P
133	M	V	Y	H	N	G	L	F	W	S	I	C	S	K	E	A	F	A	P	K	L	V
155	T	L	Y	Y	L	N	Y	L	T	K	F	V	E	L	I	D	T	V	F	L	V	L
177	R	R	K	K	L	L	F	L	H	T	Y	H	H	G	A	T	A	L	L	C	Y	T
199	Q	L	I	G	R	T	S	V	E	R	V	V	I	L	L	N	L	G	V	H	V	I
221	M	Y	W	Y	Y	F	L	S	S	C	G	I	R	V	W	W	K	Q	W	V	T	R
243	F	Q	I	I	Q	F	L	I	D	L	V	F	V	Y	F	A	T	Y	T	F	Y	A
265	H	K	Y	L	D	G	I	L	P	N	K	G	T	C	Y	G	T	Q	A	A	A	A
287	Y	G	Y	L	I	L	T	S	Y	L	L	L	F	I	S	F	Y	I	Q	S	Y	K
309	K	G	G	K	K	T	V	K	K	E	S	E	V	S	G	S	V	A	S	G	S	F
331	Y	G	V	K	T	S	N	T	K	V	S	S	R	K	A							

**Figura 4.6.** Situación del motivo "cremallera de Leucina" y de los sitios de N-glicosilación en la proteína Apa1. Se destacan recuadrados los sitios de N-glicosilación y, con doble subrayado, el dominio "cremallera de leucina".

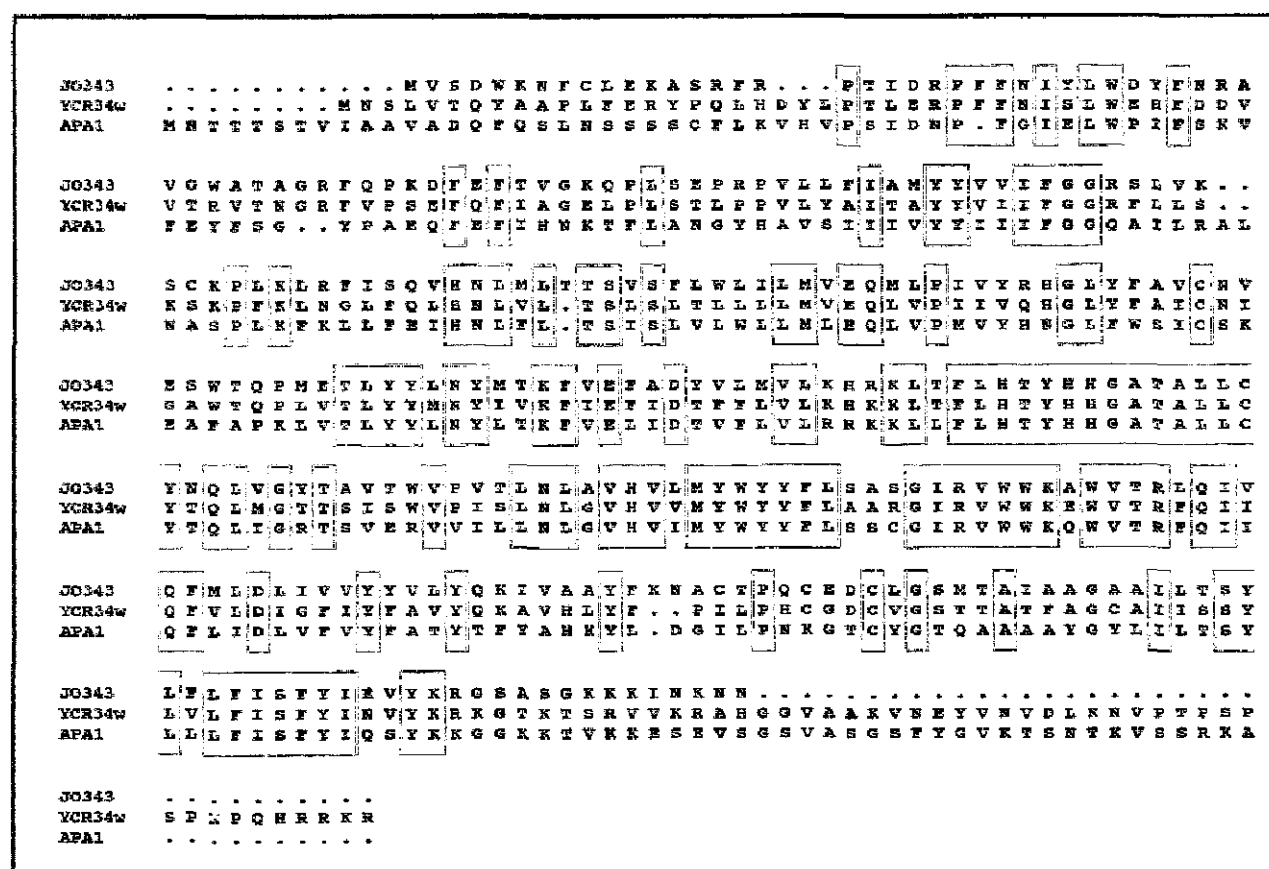
Otra característica importante de la proteína es que el extremo carboxilo terminal tiene una estructura de  $\alpha$ -hélice anfipática similar a las descritas para la unión de calmodulina (figura 4.7).



**Figura 4.7.** Estructura  $\alpha$ -hélice anfipática en el extremo C-terminal de la proteína Apa1. Se han marcado con un círculo los aminoácidos con carga (E, - ; K, +).

La comparación de la secuencia de aminoácidos de APA1 con los bancos de datos, utilizando la función FASTA del programa "UWGCG sequence analysis", dio homología con el gen YCR34w, un gen localizado en el cromosoma III de *S. cerevisiae* (Thierry y col., 1990; Oliver y col, 1992) y con el gen J0343, un gen localizado en el cromosoma X de *S. cerevisiae* (Purnellé y col., 1994). La comparación de la secuencia de aminoácidos entre estas proteínas, utilizando la función pileUP del programa "UWGCG sequence analysis", se muestra en la figura 4.8.A. La identidad entre las distintas

proteínas se muestra en la figura 4.8.B. y es aproximadamente del 50%. Los genes YCR34w y JO343 codifican para unas proteínas de membrana con seis posibles segmentos transmembrana y sus funciones son desconocidas (Goffeau y col, 1993; Purnellé y col., 1994). No se encontró homología de secuencia con ninguna otra proteína de los bancos de datos.



**Figura 4.8.A.** Comparación de la secuencia de aminoácidos entre la proteína Apa1 y otras proteínas, las cuales dieron homología usando la función FASTA del programa UWGCG Sequence analysis. El alineamiento se realizó según la función PileUP del paquete de programas de UWGCG Sequence analysis.

	JO343	YCR34w	APA1
JO343	100	56.5	50
YCR34w	---	100	47
APA1	---	—	100

**Figura 4.8.B.** Porcentajes de identidad entre las distintas proteínas .

#### 4.5.- EXPRESIÓN DEL GEN APA1.

La presencia en la región 5' no codificada de APA1 de dos motivos que actúan activamente en la expresión de algunos genes, como son la caja  $UAS_{RPG}$  y las secuencias CTCC, nos permite suponer que la expresión de APA1 estaría regulada de un modo similar a la de otros genes donde se encuentran ambos motivos. En todos los casos en los que se han visto ambos motivos, los genes son inducibles por la presencia de glucosa en el medio de cultivo (Huet y col., 1985; Lue y Kornberg, 1987) y es necesaria la presencia del factor de transcripción GCR1 para el mantenimiento de los niveles basales de expresión (Tornow y col, 1993).

Para comprobar si la expresión de APA1 estaba mediada por dos factores, como son la presencia de glucosa en el medio y GCR1, decidimos realizar un doble abordaje.

En primer lugar medimos la expresión de APA1 mediante un análisis Northern de cepas GCR1 y  $\Delta gcr1$  creciendo con y sin glucosa.

Por otro lado, en idénticas condiciones que en el análisis Northern, se midió la expresión del gen quimérico construido mediante la fusión del promotor y parte de la zona codificante del gen APA1 a la región codificante del gen LacZ. La construcción de este gen quimérico se muestra en la figura 4.9.

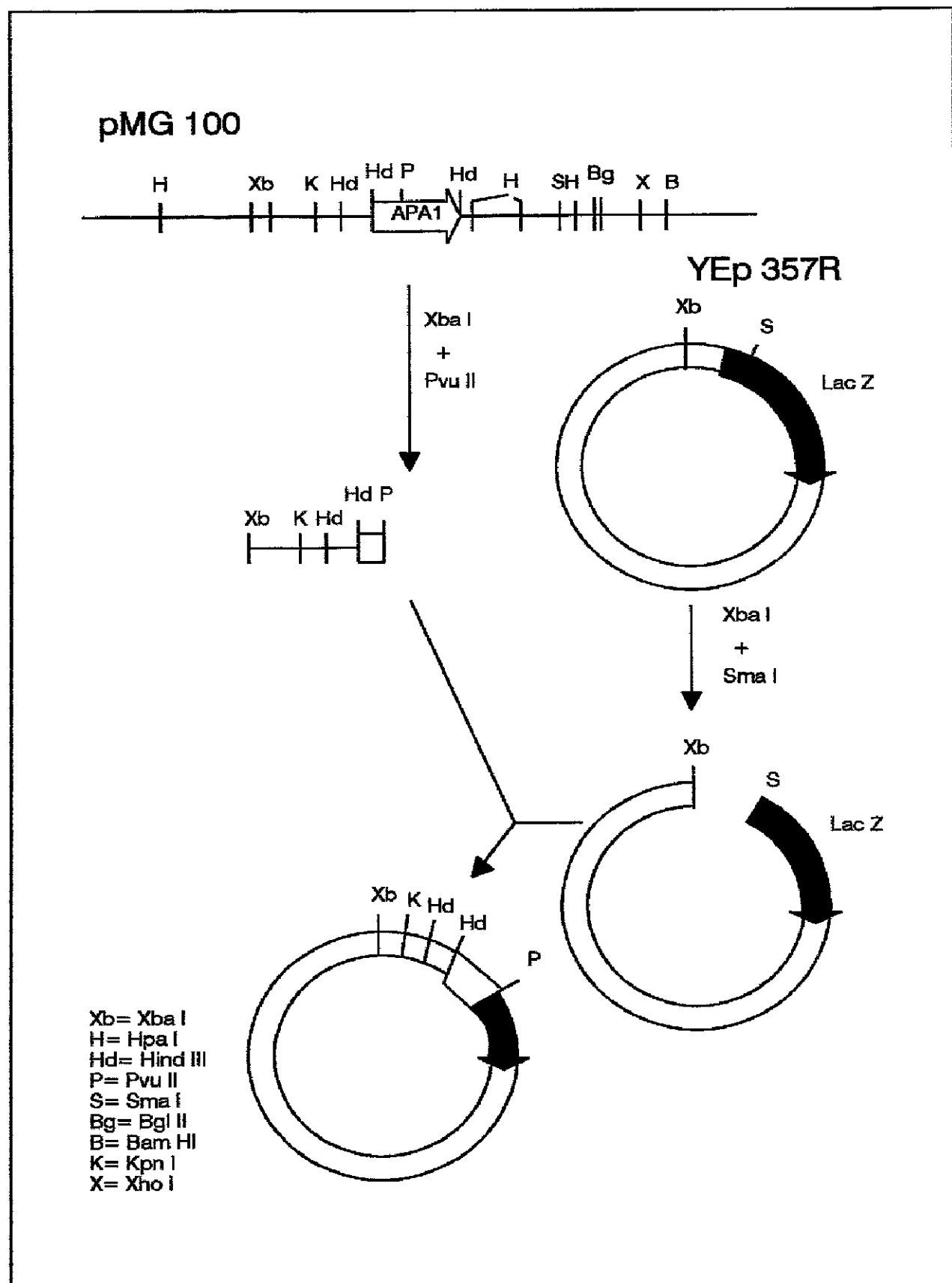
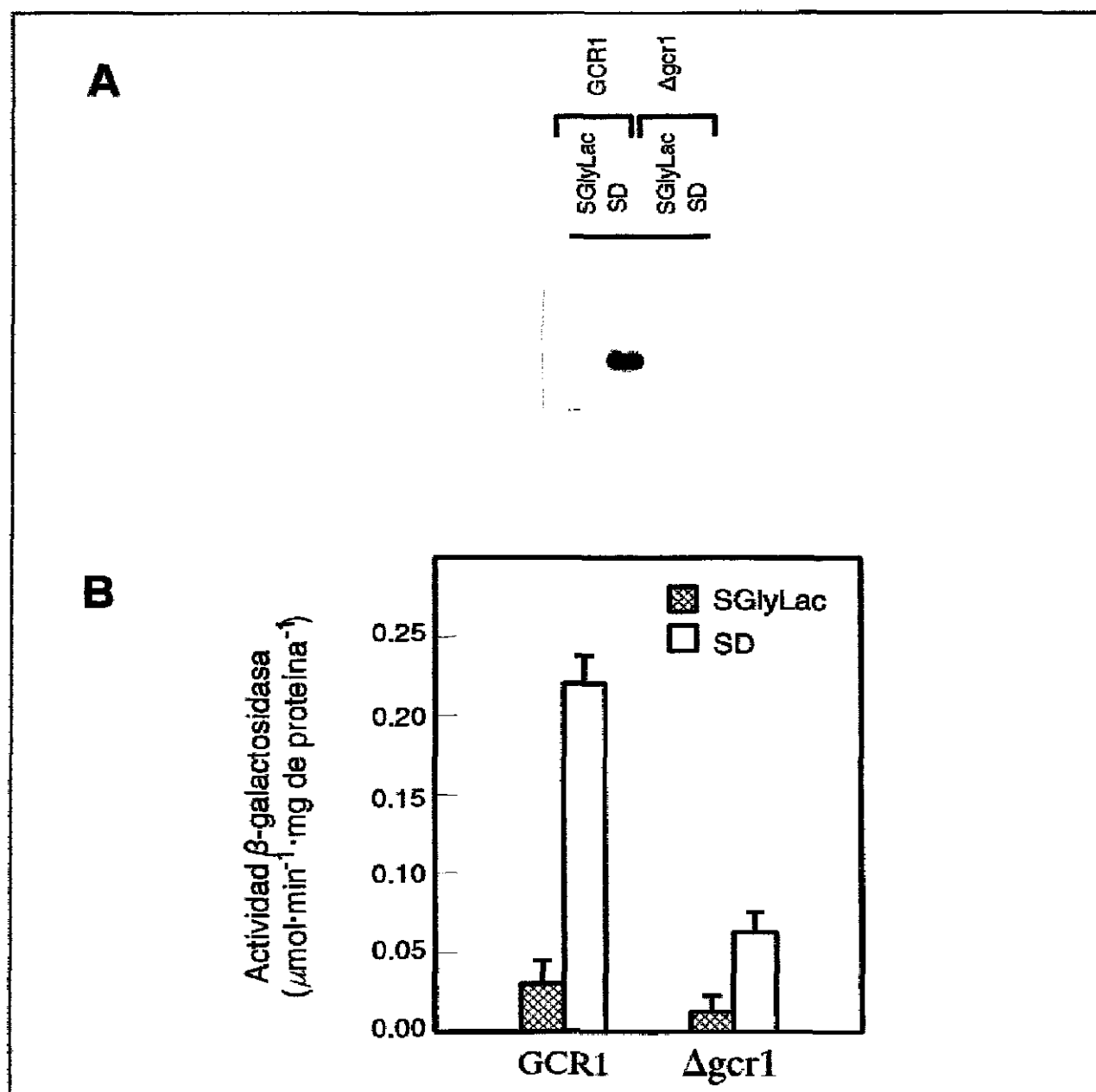


Figura 4.9. Obtención del plásmido pMG123.

El análisis de Northern mostró en la cepa silvestre una banda de hibridación de aproximadamente 1.3 kb en concordancia con el tamaño de APA1, que aumentaba cuando las células crecían en medio con glucosa. Un incremento similar se observa cuando se estudia la expresión del gen quimérico (Figura 4.10).



**Figura 4.10.** A: Análisis Northern de la expresión APA1 en cepas GCR1 y Δgcr1. B: Niveles de actividad β-galactosidasa (cepas APA1-LacZ) en cepas GCR1 y Δgcr1. Las células de levadura fueron crecidas en medios con glicerol más lactato o glucosa y fueron recogidas durante la fase exponencial, posteriormente se obtuvo el RNA total o se midió la actividad β-galactosidasa. Los valores de la actividad β-galactosidasa provienen del valor medio de tres experimentos diferentes representándose la desviación estándar.



Cuando el mismo análisis se realiza en cepas en las que el gen GCR1 ha sido delecionado, se observa que la cantidad de transcrito es significativamente menor que en la cepa parental, pero que la expresión es aún mediada por glucosa. Resultados similares se observan cuando se mide la expresión del gen quimérico. (fig. 4.10).

Este resultado permite suponer que la expresión de APA1 está mediada, al menos, por glucosa y por el factor de transcripción GCR1 y que, por tanto, la regulación de su expresión será similar a la de genes que codifican enzimas de la glicolisis o de la maquinaria de traducción de proteínas.

#### **4.6.- OBTENCIÓN DE UNA CEPA DE LEVADURA PORTADORA DE UNA DELECIÓN DEL GEN APA1.**

Una vez caracterizado el gen APA1, procedimos a realizar un estudio funcional del mismo. Para ello nos propusimos en primer lugar generar cepas de levaduras que no expresasen la proteína codificada por el gen APA1.

El proceso seguido para la delección del gen APA1 se esquematiza en la figura 4.11.

A partir del gen APA1, previamente clonado en el plásmido pRS316, se construyó el plásmido pMG119, en el que se ha delecionado un fragmento *Hind III* de aproximadamente 1.3 kpb que contiene la secuencia completa del gen APA1 y en su lugar se ha insertado el gen marcador URA3.

El plasmido pMG119, linearizado mediante digestión con las enzimas *Kpn I* y *Sal I*, se utilizó para transformar un autodiploide de la cepa BWG1-7A. Los transformantes se seleccionaron en medio mínimo carente de uracilo.

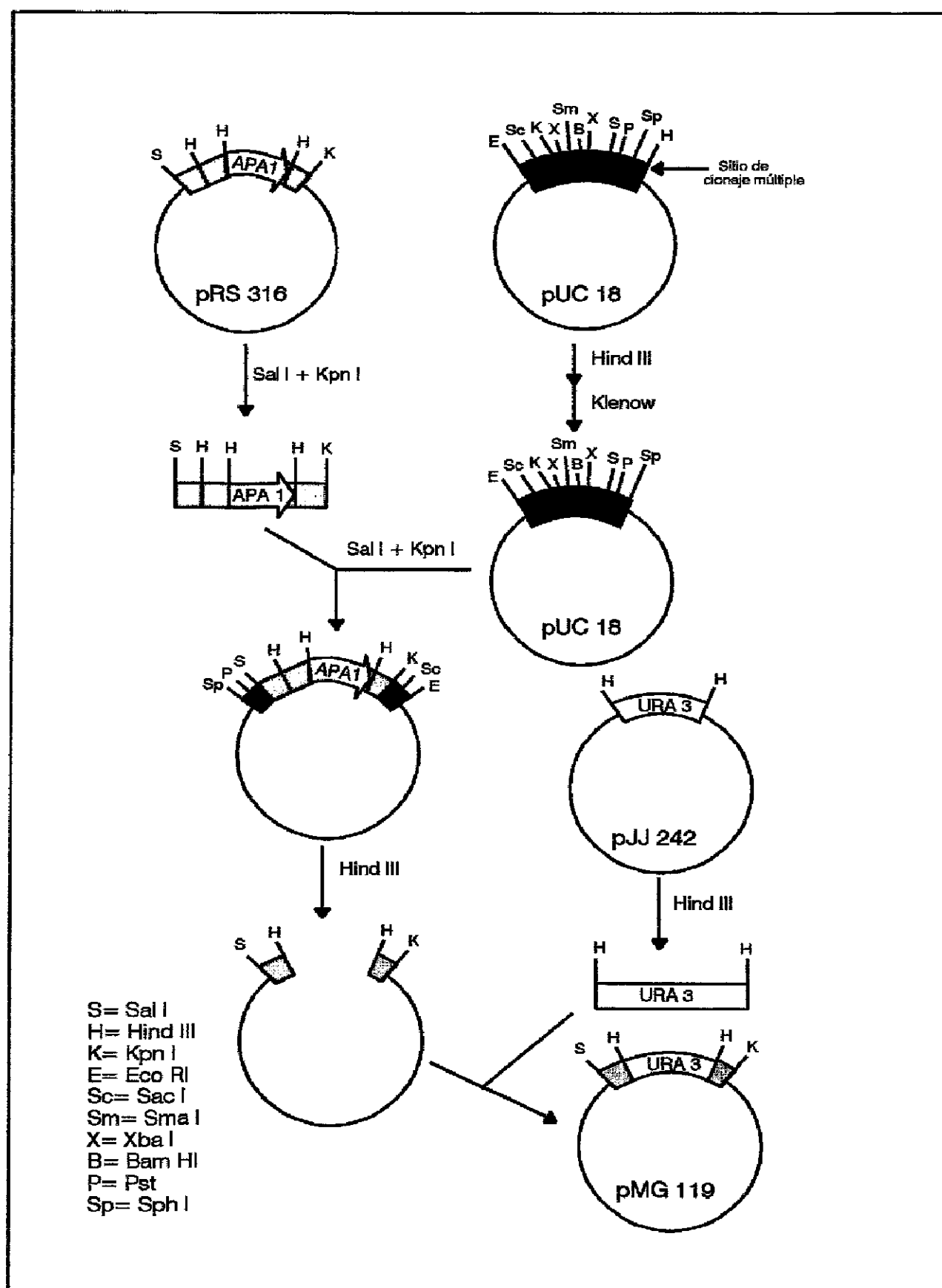


Figura 4.11. Obtención del plásmido pMG119 (Δapa1).

Para comprobar que la copia delecionada del gen se había integrado en el locus APA1, se extrajo DNA total de la cepa BWG1-7A y de los transformantes  $Ura^+$ , se digirió con las enzimas *Sal*I - *Kpn*I, y se hibridaron con la sonda *Xba*I - *Pst*I, que contenía el gen URA3 (Rose y Winston, 1984) proveniente del plásmido pJJ242. Los transformantes que llevaban una copia del gen delecionado, se detectan por la presencia de una banda de 3.1 kb de acuerdo con el mapa de restricción del locus APA1, como se ve en la figura 4.12.

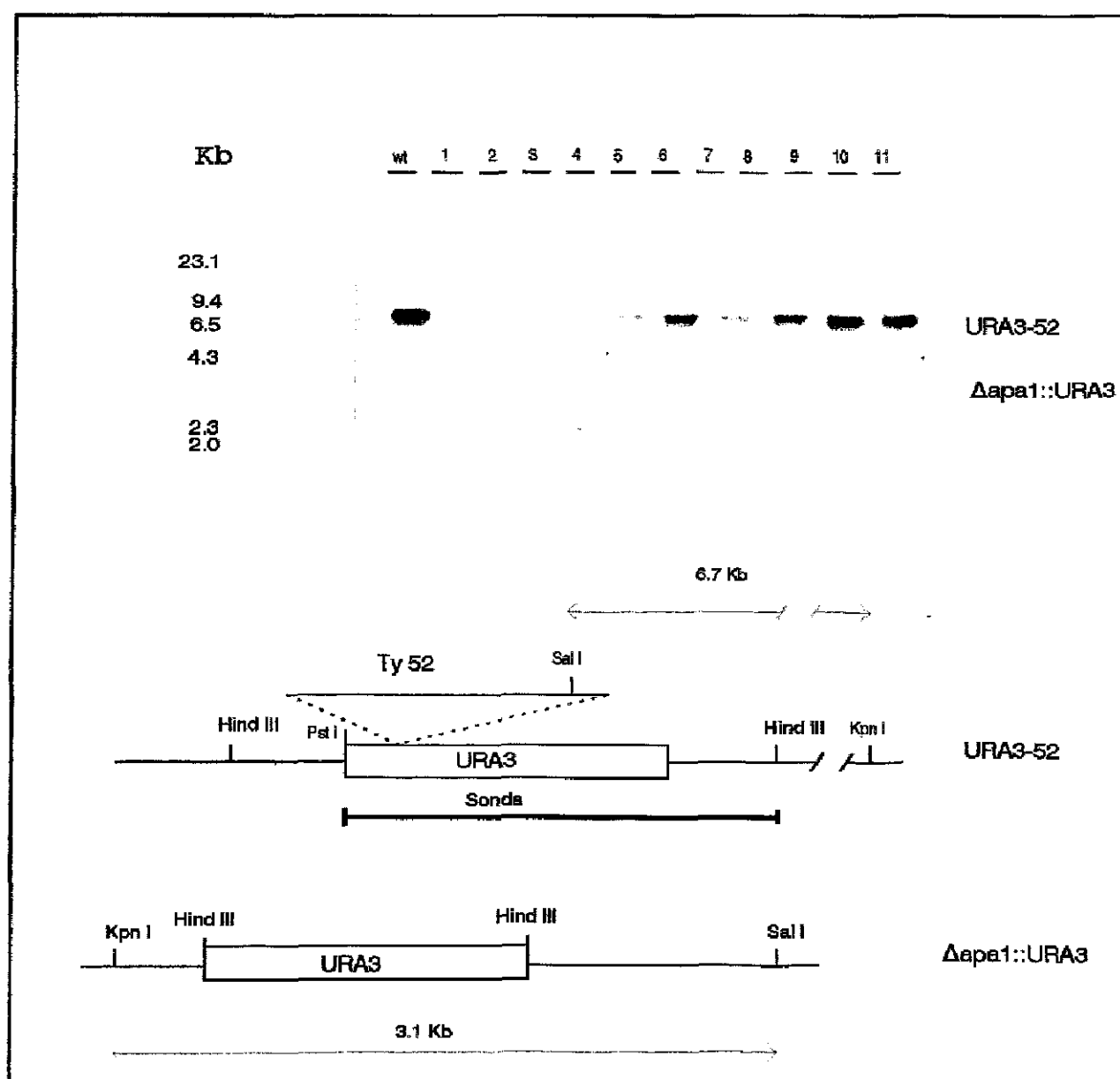
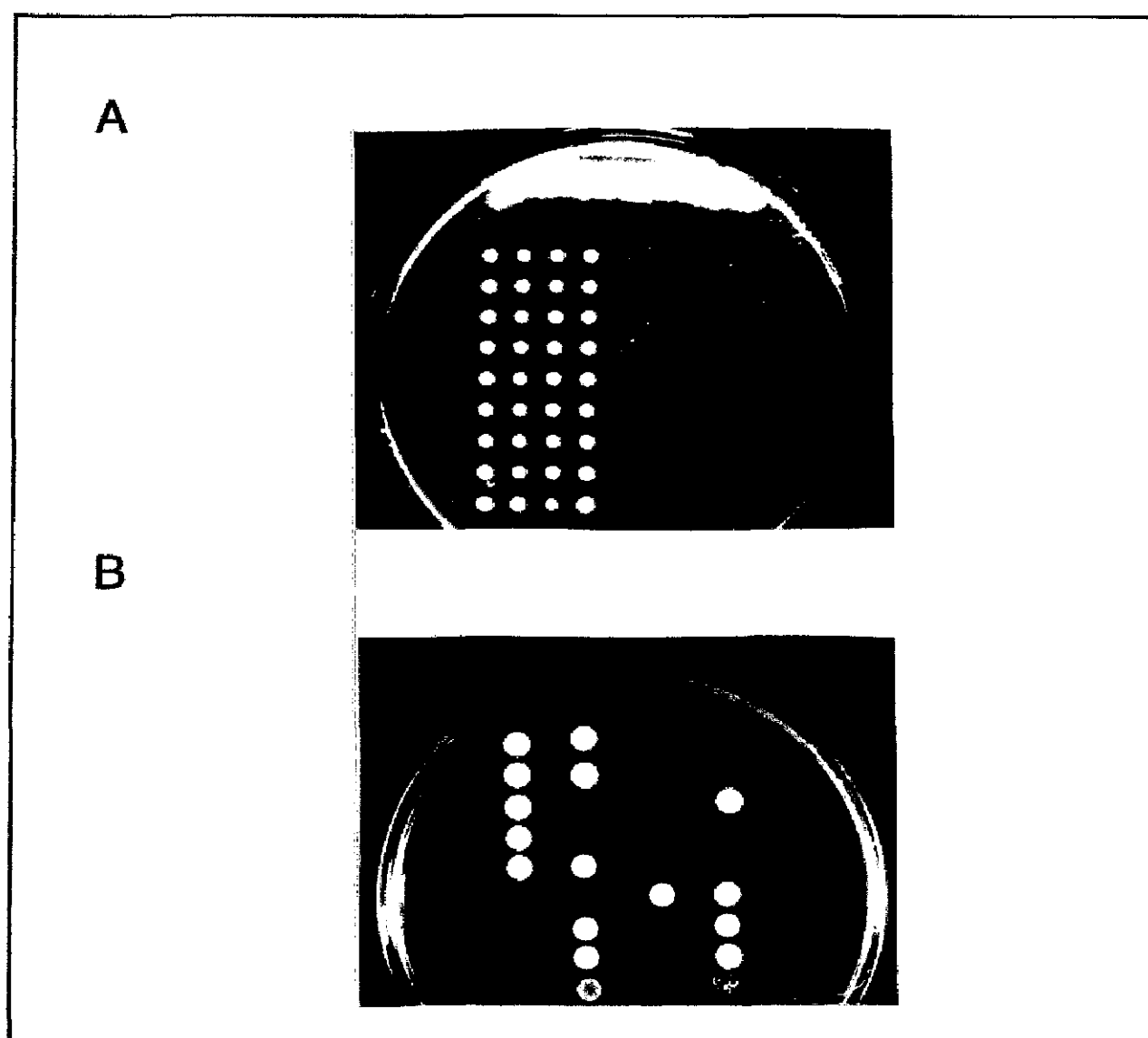


Figura 4.12. Análisis Southern de las cepas diploides en las que se ha delecionado el gen APA1.

Una vez realizada la delección del gen APA1, los diploides se esporularon y se sometieron a un análisis de tétradas, donde se analizó la co-segregación de los fenotipos de sensibilidad de crecimiento a pH ácido y prototrofia para uracilo. Se analizaron en total 9 ascas completas. En todas ellas, el fenotipo sensibilidad a pH ácido mostró una segregación  $2^+ : 2^-$  (figura 4.13). Todas las esporas cuyo crecimiento era sensible al pH del medio eran  $Ura^+$ , lo que sugería que ambos fenotipos iban asociados.



**Figura 4.13. Análisis de tétradas del diploide heterocigótico APA1/Apa1. A: Crecimiento de las esporas en YPD. B: Crecimiento de las esporas en medio mínimo a pH 3.0..**

Una de las esporas se cruzó con el mutante apa1-3 original y se sometió a un análisis de tétradas. En 10 tétradas completas se observó una segregación 4:0<sup>+</sup> respecto al crecimiento a pH ácido, sugiriendo que el gen clonado efectivamente corresponde al mutado en la estirpe apa1-3.

#### **4.7.- EFECTO DE LA DELECIÓN APA1 SOBRE LA H<sup>+</sup>-ATPasa DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.**

##### **4.7.1. Efectos sobre la actividad, constantes cinéticas de la enzima y pH intracelular.**

Una vez generadas cepas carentes del gen APA1, se procedió a analizar el efecto de la delección sobre los niveles de H<sup>+</sup>-ATPasa.

En primer lugar analizamos el efecto sobre los niveles de actividad en membrana plasmática y por otro lado medimos las variaciones en el pH intracelular. Los resultados se muestran en la tabla 4.3. El experimento se realizó a partir de membranas plasmáticas purificadas de cepas que habían crecido en un medio con glucosa y tamponado a pH neutro.

Como se puede apreciar, bajo las condiciones anteriormente reseñadas, la actividad ATPasa en las cepas portadoras de la delección era significativamente inferior a la de la cepa parental. También se puede observar que la presencia de APA1 en un plásmido multicopia no tiene un efecto apreciable sobre las propiedades de la enzima.

**Tabla 4.3. Efecto de la mutación *apa1* sobre las propiedades cinéticas de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática y sobre el pH intracelular.**

GENOTIPO RELEVANTE	ACTIVIDAD <sup>a</sup> ATPasa	Km <sup>b</sup>	Vmax <sup>c</sup>	pH <sub>opt</sub>	pH intracelular
APA1	1.15	0.40	3.00	6.5	7.00
$\Delta$ apa1::URA3	0.35	0.40	0.95	6.5	6.60
$\Delta$ apa1::URA3+YCp-APA1	1.10	0.45	2.85	6.5	6.94
$\Delta$ apa1::URA3+YE <sub>p</sub> -APA1	0.90	0.40	2.70	6.5	7.00

La actividad ATPasa se midió en membrana plasmática purificada a un pH de 6.5 con 2 mM ATP.

a:  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ .

b: mM

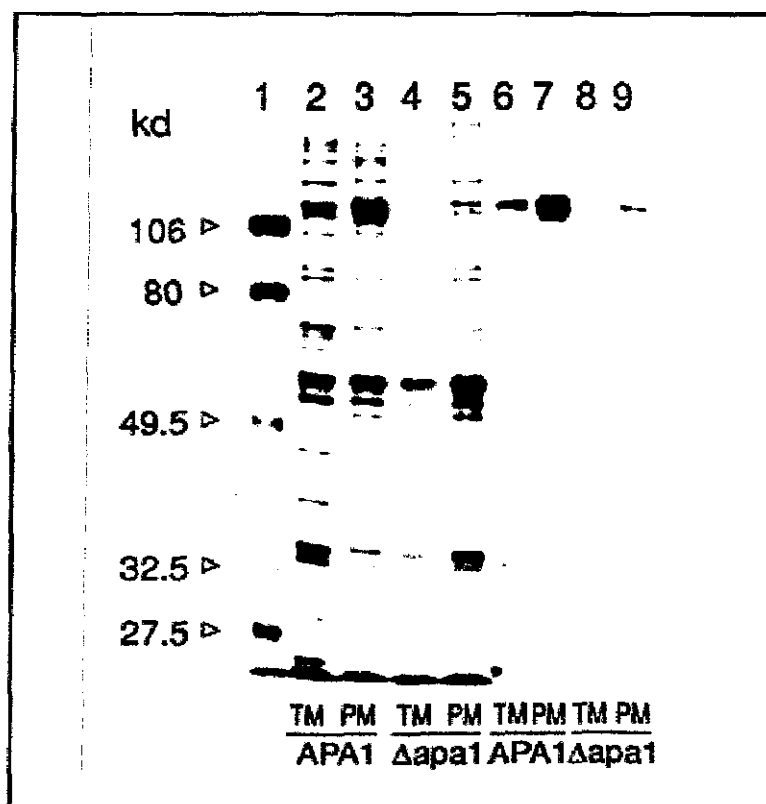
c:  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ .

Como se ha mencionado anteriormente, la H<sup>+</sup>-ATPasa es esencial para la regulación del pH intracelular, de acuerdo con esto y, como se aprecia en la tabla 4.3, los mutantes  $\Delta$ apa1 presentan un pH intracelular más ácido que la cepa parental. Esta defectiva regulación del pH puede explicar la sensibilidad del crecimiento de la cepa a pH ácido.

El estudio de las constantes cinéticas de la enzima (tabla 4.3.) sugiere que los bajos niveles de actividad encontrados en la cepa carente de APA1 no son debidos a cambios en la constante de afinidad por ATP de la enzima o en su pH óptimo, sino a una reducción de la Vmax. En nuestras condiciones experimentales, estos resultados sugieren que los bajos niveles de actividad ATPasa en los mutantes  $\Delta$ apa1 no son debidos a alteraciones estructurales de la enzima, sino que pueden ser debidos a una disminución de la concentración de la enzima en la membrana.

#### 4.7.2. Efectos de la mutación $\Delta$ apa1 sobre los niveles de Pma1 en la membrana plasmática.

Como vimos en el apartado anterior, no se observan variaciones en las constantes cinéticas de la enzima causadas por la mutación  $\Delta$ apa1, por lo que sugerimos que la mutación pueda reducir la concentración de la enzima en la membrana plasmática, bien por acumulación en alguna otra membrana celular, bien porque afecte a la síntesis o estabilidad de la enzima. Para comprobarlo, purificamos membranas totales y membrana plasmática a partir de la cepa mutante  $\Delta$ apa1 y su cepa parental, y medimos los niveles de  $H^+$ -ATPasa mediante análisis de Western. Como se observa en la figura 4.14, los niveles de la enzima, tanto en membrana total, como en membrana plasmática, eran menores en las cepas mutantes que en la cepa de levadura silvestre, además, el hecho de que la cantidad de enzima fuera también inferior en las membranas totales, implicaba que la  $H^+$ -ATPasa no se acumulaba en ningún sistema de membrana celular, o lo que es lo mismo, que la mutación  $\Delta$ apa1::URA3 afectaba a la síntesis o estabilidad de la enzima.



**Figura 4.14.** Análisis de la cantidad existente de proteína Pma1 en membranas plasmáticas y membranas totales en cepas APA1 y  $\Delta$ apa1. Electroforesis en gel SDS-poliacrilamida (líneas 2-5) y análisis de "Western blot" (líneas 6-9) de membranas totales (TM) y membranas plasmáticas (PM) en cepas APA1 y  $\Delta$ apa1. Cada línea contiene 10  $\mu$ g de proteína. Los anticuerpos contra Pma1 fueron purificados por afinidad. La línea 1 muestra la posición de las proteínas marcadoras del tamaño molecular indicado en kilodaltons.

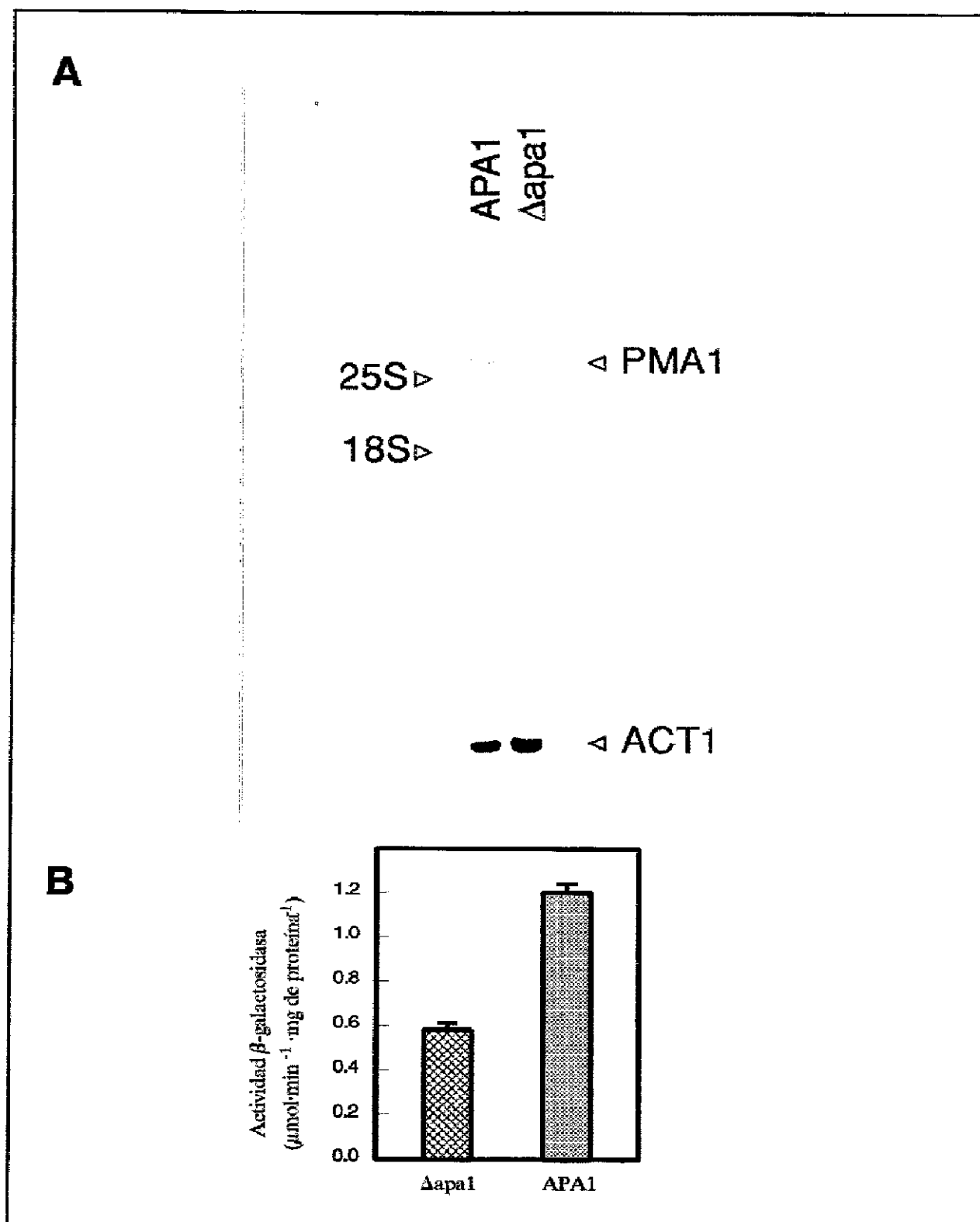
#### **4.8.- EFECTO DE LA MUTACIÓN $\Delta$ apa1 SOBRE LOS NIVELES DE mRNA.**

Una vez que sabíamos que los bajos niveles de  $H^+$ -ATPasa en la membrana plasmática de la levadura mutante  $\Delta$ apa1 se debía, bien a una disminución en la síntesis de la enzima, bien a un aumento de la inestabilidad de la enzima, decidimos realizar un análisis de Northern del RNA total de las cepas APA1 y  $\Delta$ apa1, para comprobar si los bajos niveles de proteína se debían a un defecto en la transcripción del gen. Como se puede apreciar en la figura 4.15.A., el mutante apa1 muestra reducidos niveles de PMA1 mRNA, frente a los niveles que presenta la cepa APA1, lo que induce a pensar que la mutación  $\Delta$ apa1 afecta a los niveles de transcripción del gen PMA1, o bien, afecta a la estabilidad del mRNA.

Para discernir entre estas dos últimas posibilidades y determinar cual de estos dos parámetros estaban afectados por la delección de APA1, decidimos analizar la expresión de un gen quimérico (PMA1 - LacZ), en el que el promotor de PMA1 se ha fusionado al gen LacZ (Eraso y col., 1987). Este tipo de análisis permite ver la diferencia de expresión de un gen, debido a la diferencia en los niveles de transcripción.

Como se aprecia en la figura 4.15.B., los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa en el mutante  $\Delta$ apa1 eran inferiores que en la cepa parental. Estos resultados, sugieren que la delección de APA1 afecta los niveles de la ATPasa de la membrana plasmática, debido a un modificación de los niveles de transcripción del gen.

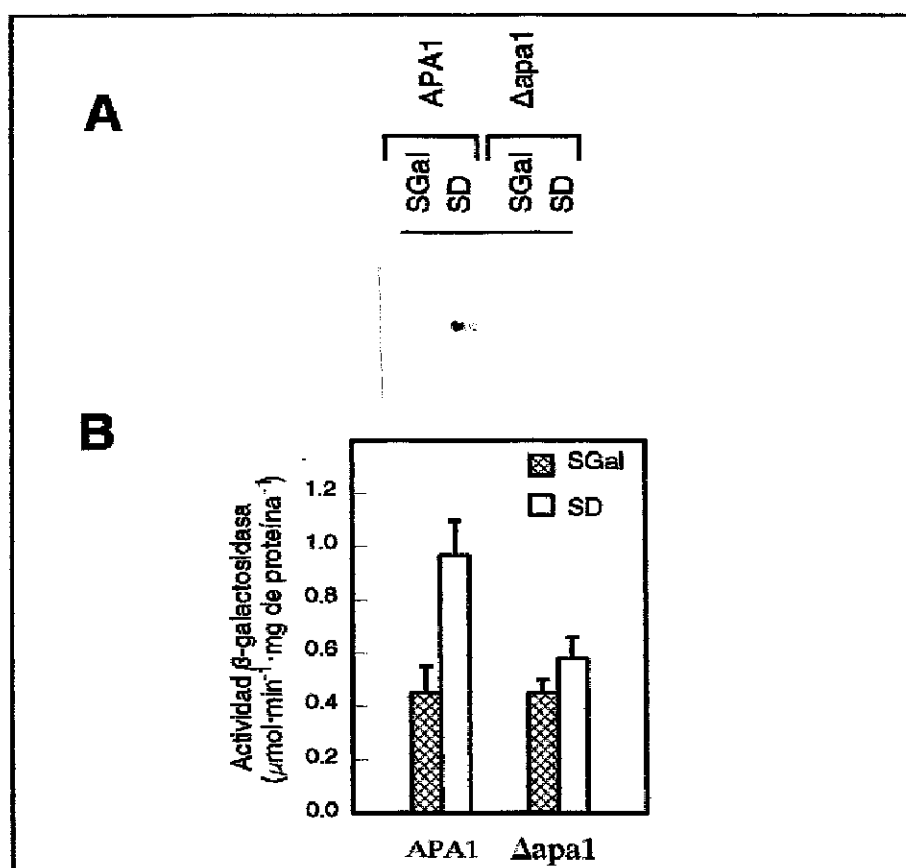




**Figura 4.15.** Análisis Northern de la expresión de PMA1 (A) y actividad PMA1-LacZ (B) en cepas APA1 y  $\Delta$ apa1. El RNA se aisló de células de levadura recogidas en fase exponencial en SD a pH 6.0. Se usó como sonda un fragmento de 5kb *Hind III* que contiene entero el gen PMA1 (Serrano y col., 1986). El filtro se rehibridó con una sonda de actina de levaduras como control interno. El proceso para obtener el RNA y los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa fueron los descritos en materiales y métodos. Los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa son la media de tres experimentos diferentes, marcando la desviación estándar.

#### 4.9.- EFECTO DE LA DELECIÓN DE APA1 SOBRE LA REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE PMA1 POR GLUCOSA.

En un trabajo publicado previamente (Rao y col., 1993), se había demostrado que la transcripción de PMA1 está regulada por glucosa. La presencia de glucosa en el medio de cultivo aumenta la velocidad de transcripción de PMA1. Por tanto, era interesante determinar si APA1 está implicado en esta regulación. Para ello, en primer lugar, se realizó un análisis Northern del RNA total de las cepas  $\Delta$ apa1 y APA1, crecidas en medio con glucosa o galactosa a pH neutro y, en segundo lugar, se analizó la expresión del gen quimérico PMA1::LacZ, en las mismas cepas y en las mismas condiciones (figura 4.16).



**Figura 4.16.** Análisis Northern de la expresión PMA1 (A) y actividad PMA1-LacZ (B) en cepas APA1 y  $\Delta$ apa1 crecidas en medio con glucosa o galactosa. Las células de levadura fueron recogidas durante la fase exponencial de crecimiento y fueron procesadas como se describe en materiales y métodos. Los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa son la media de tres experimentos diferentes.

Como se aprecia en la figura 4.16, el transcrito de PMA1 en la cepa APA1 era más abundante cuando las células crecían en glucosa, mientras que en la cepa  $\Delta$ apa1, este incremento no era observado. Resultados similares se obtuvieron cuando se analizó la expresión del gen quimérico PMA1::LacZ. Estos resultados sugieren que APA1 está involucrado en la regulación de la transcripción de PMA1 por glucosa.

#### **4.10.- EFECTO DE LA DELECIÓN DEL GEN APA1 SOBRE LA EXPRESIÓN DE OTROS GENES.**

La expresión del gen PMA1 de levaduras está controlada por la proteína TUF/RAP1/GRF1 (Capieaux y col., 1989). Este factor de transcripción está implicado en el control de crecimiento de levaduras, y afecta a la transcripción de genes que codifican por proteínas ribosomales, aa-tRNA sintetasas, factores de elongación, factores de iniciación y enzimas que participan en la glicolisis.

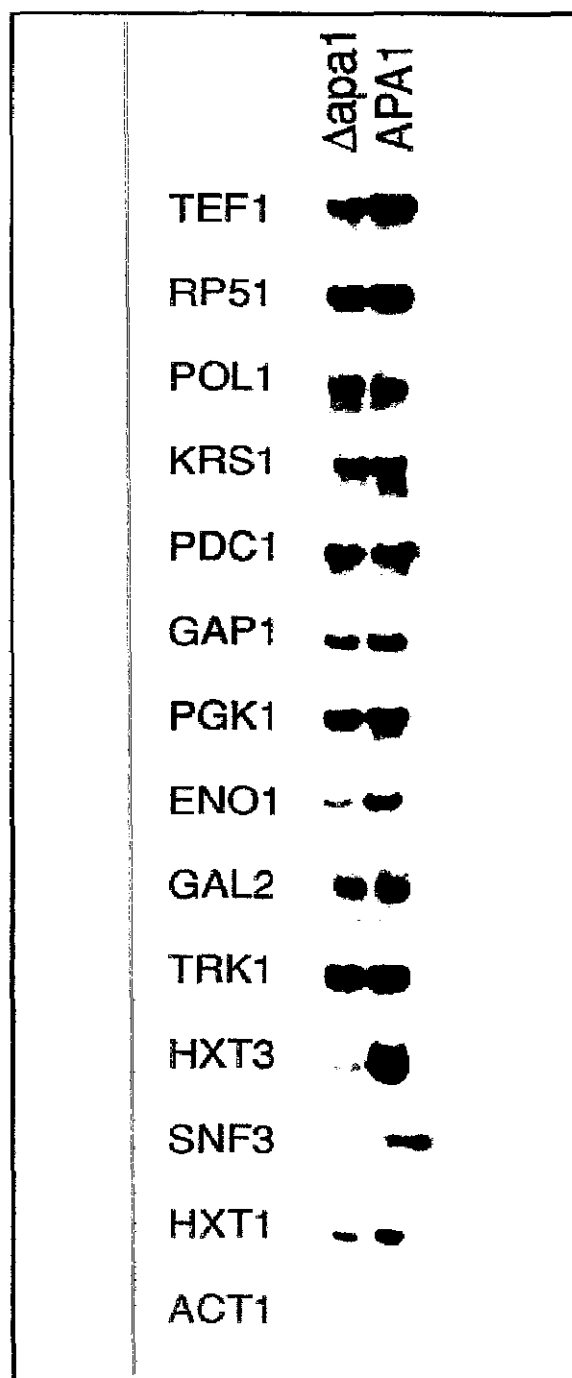
Para determinar si la reducción que observábamos en el mRNA de PMA1 en el mutante  $\Delta$ apa1, se debía a un efecto general en los genes regulados por el factor TUF, se realizó un análisis Northern, de RNA total de cepas  $\Delta$ apa1 y APA1, utilizando como sondas fragmentos de DNA de genes cuya expresión se sabe que está regulada por el factor TUF/RAP1/GRF1. Los resultados, que se presentan en la figura 4.17, nos muestran que, no se afecta significativamente la expresión de ninguno de los genes analizados [TEF1 (factor de elongación 1  $\alpha$ ), RP51 (proteína ribosomal 51), POL1 (subunidad grande de la RNA polimerasa A), KRS1 (Lysyl-tRNA sintetasa), PDC1 (piruvato descarboxilasa), GAP1 (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa), PGK1 (fosfoglicerato quinasa), y ENOL1 (enolasa 1)]. Estos resultados sugieren que el efecto de APA1 sobre la expresión de PMA1 no ocurre probablemente a través del factor TUF1/RAP1/GRF1.

Por otro lado, el hecho de que el gen PMA1 codifique una proteína de membrana plasmática de levadura, nos hizo pensar que la mutación  $\Delta$ apa1, podría afectar a algún otro gen que codifique otra proteína de la membrana plasmática. Realizamos un análisis Northern, usando como sondas fragmentos de DNA de genes que codifican proteínas de la membrana plasmática: GAL2 (transportador de galactosa), TRK1 (transportador de  $K^+$ ), HXT1, HXT3 y SNF3, (transportadores de glucosa).

Los resultados se muestran en la figura 4.17, donde podemos apreciar que la mutación  $\Delta$ apa1 no tiene ningún efecto sobre la expresión de GAL2 y TRK1, pero sí sobre los niveles de mRNA de los genes HXT3 y SNF3. HXT3 y SNF3 pertenecen a una familia de genes que codifica transportadores de glucosa y la expresión de ambos aumenta con la glucosa (Ko y col., 1993).

No obstante, HXT1, otro miembro de la misma familia, no ve afectada su expresión por la mutación  $\Delta$ apa1.

**Figura 4.17. Análisis Northern de la expresión de los distintos RNAs en cepas APA1 y  $\Delta$ apa1.** El RNA total se obtuvo a partir de colonias crecidas logarítmicamente y se aplicaron 10  $\mu$ gr a cada línea. Los filtros fueron hibridados con sondas de DNA de: factor de elongación 1  $\alpha$ , TEF1; proteína ribosomal 51, RP51; subunidad grande de la RNA polimerasa A, POL1; Lysyl-tRNA sintetasa, KRS1; piruvato descarboxilasa, PDC1; gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, GAP1; fosfoglicerato quinasa, PGK1; enolasa 1, ENO1; transportador de galactosa GAL2; transportador de potasio, TRK1; transportadores de glucosa SNF3, HXT3, y HXT1. Una sonda de DNA de actina (ACT1) se usó como control interno de la cantidad de carga en el gel.



---

Estos hechos, parecen sugerir que APA1 está implicado en la regulación de genes que codifican proteínas que se van a localizar en la membrana plasmática y cuya expresión está regulada por glucosa.











#### **4.11.- LA MUTACIÓN *apa1* AFECTA INDEPENDIENTEMENTE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES PMA1, HXT3 Y SNF3.**

Como hemos visto en el apartado anterior, la mutación  $\Delta$ apa1 afecta la expresión de, al menos, dos transportadores de glucosa, y por tanto, es posible que la capacidad de transporte de glucosa en los mutantes  $\Delta$ apa1 esté disminuida.

Ya que la expresión de PMA1 es inducida por glucosa, es posible pensar que APA1 no está involucrado en la expresión de PMA1, sino que la carencia de APA1 afecta la expresión de PMA1 debido a una disminución en la capacidad del transporte de glucosa, como consecuencia de una modificación en la expresión de HXT3 y SNF3.

Para determinar si APA1 estaba involucrado en la expresión de PMA1 por glucosa o bien la disminución de la expresión del gen era debida a la menor expresión de HXT3 y SNF3, se transformó la cepa  $\Delta$ apa1 con los genes HXT1, SNF3 y HXT3 en plásmidos multicopia y se determinó la capacidad de transporte de las cepas transformadas y su capacidad para crecer en medio ácido.

Como se aprecia en la figura 4.18, ninguno de los genes utilizados es capaz de suprimir completamente el fenotipo de crecimiento sensible a pH ácido y, cuando se midió la capacidad de transporte de las distintas cepas, se observó que el gen HXT1 en plásmido multicopia era capaz de suprimir el defecto en el transporte de glucosa ocasionado por la mutación  $\Delta$ apa1.

	CRECIMIENTO EN:		TRANSPORTE DE GLUCOSA	
	SD 6.0	SD 3.0	$(\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg levadura}^{-1})$	
			<u>Galactosa</u>	<u>Glucosa</u>
APA1			$10.50\pm 0.98$	$4.30\pm 0.77$
$\Delta\text{apa1}$			$4.42\pm 0.37$	$3.30\pm 0.55$
$\Delta\text{apa1} + \text{YEp-HXT3}$			$4.41\pm 0.87$	$3.40\pm 0.93$
$\Delta\text{apa1} + \text{YEp-}\dot{\text{SNF3}}$			$4.21\pm 0.52$	$3.20\pm 0.40$
$\Delta\text{apa1} + \text{YEp-HXT1}$			$7.30\pm 0.70$	$7.99\pm 0.36$

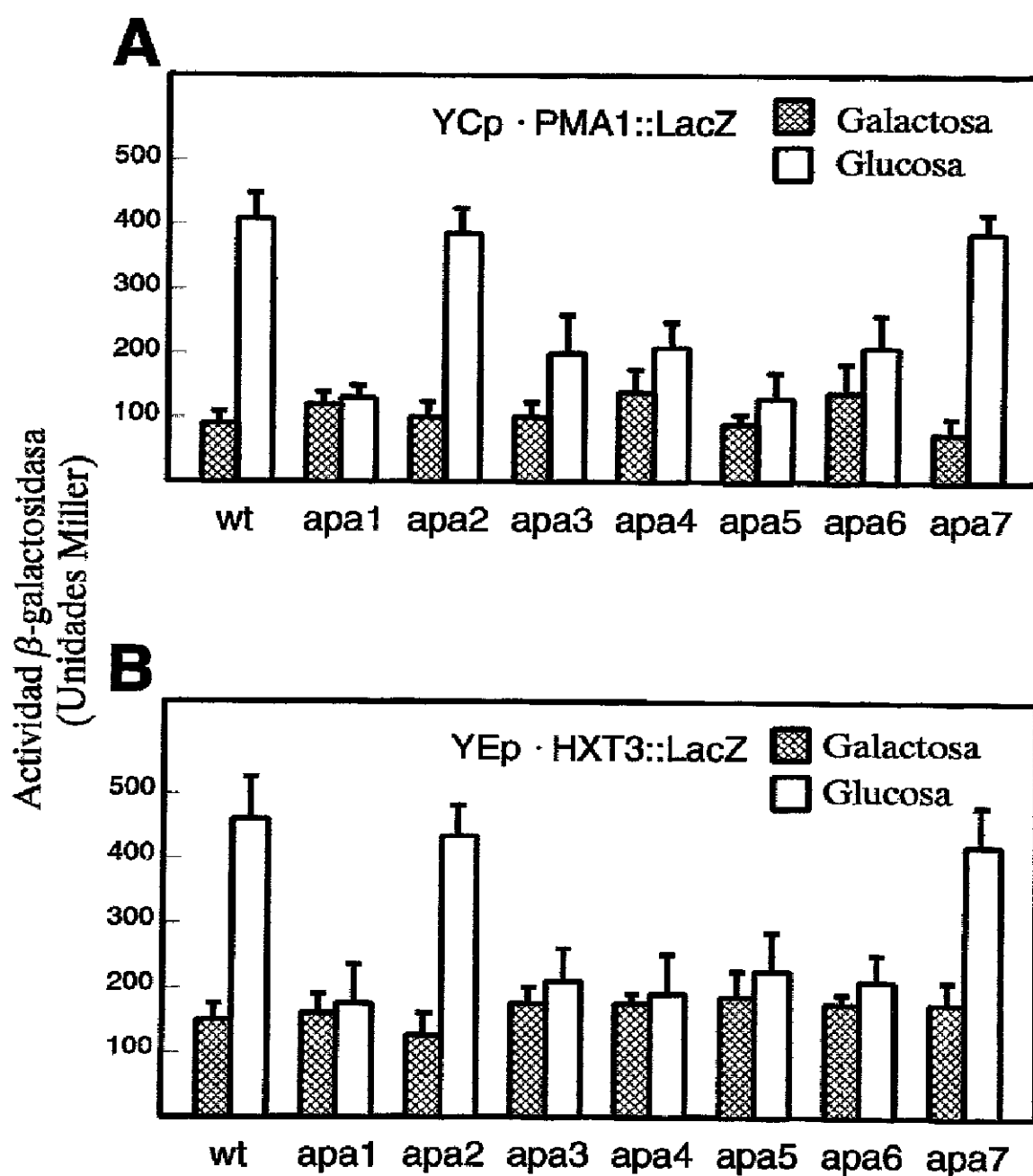
**Figura 4.18.** Análisis del fenotipo de crecimiento y transporte de glucosa en cepas APA1 y  $\Delta\text{apa1}$  transformadas con plásmidos multicopia que contienen genes de los distintos transportadores de glucosa. Las células de levadura fueron crecidas en medios con glucosa o galactosa, recogidas durante la fase logarítmica. Los ensayos de transporte de glucosa se describen en materiales y métodos. Los valores son la media de tres experimentos diferentes  $\pm$  la desviación estándar.

Este resultado sugiere que el efecto de APA1 sobre la expresión de PMA1 es funcionalmente independiente de la capacidad de transporte de glucosa por la levadura.

#### 4.12.- EFECTO DE LAS MUTACIONES $\text{apa2-apa7}$ SOBRE LA EXPRESIÓN DE PMA1 Y HXT3.

Como hemos visto en los apartados anteriores, la delección del gen APA1 afecta a expresión de PMA1 y HXT3.

Para determinar si las mutaciones  $\text{apa2-apa7}$  afectaban también la expresión de esos genes, se estudió la expresión de los genes quiméricos  $\text{PMA1}::\text{LacZ}$  y  $\text{HXT3}::\text{LacZ}$ . Como se aprecia en la figura 4.19, las mutaciones en los genes  $\text{apa3}$ ,  $\text{apa4}$ ,  $\text{apa5}$  y  $\text{apa6}$  afectan la regulación de la expresión de ambos genes por glucosa.



**Figura 4.19.** Medidas de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la expresión de genes PMA1::LacZ y HXT3::LacZ en cepas apa1-apa7 crecidas en medio con glucosa o galactosa. Las células de levadura se recogieron en fase exponencial y se procesaron como se describe en materiales y métodos. Los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa son la media de tres experimentos diferentes, registrándose la desviación estándar.

## **CAPITULO 5.- DISCUSIÓN.**



El objetivo del presente trabajo fue aislar mutantes que tuviesen bajos niveles de actividad  $H^+$ -ATPasa y, una vez aislados, caracterizar los genes implicados. Para aislar estos mutantes, utilizamos el método descrito por McCusker y col (1987), esto es, en primer lugar aislamos mutantes resistentes a higromicina B, que es un antibiótico cargado positivamente que se une a los ribosomas e inhibe la biosíntesis de proteínas, y en segundo lugar, seleccionamos aquellos que presentaban un crecimiento sensible a pH ácido. De los cuatrocientos mutantes aislados resistentes a higromicina B, treinta y cuatro presentaban un crecimiento sensible al pH ácido del medio y, midiendo la actividad  $H^+$ -ATPasa, presentaban unos niveles más bajos que la cepa parental. Posteriormente, realizamos un análisis genético de los mutantes seleccionados, el cual nos permitió clasificarlos en siete grupos de complementación a los que denominamos, de forma arbitraria, desde APA1 a APA7 (genes que afectan a la actividad ATPasa de la membrana plasmática). De los siete genes, decidimos estudiar a lo largo de este trabajo uno de ellos, APA1, que representaba al que contenía más número de mutantes.

A partir de una librería genómica de levaduras, aislamos el gen APA1 por complementación del fenotipo de sensibilidad de crecimiento a pH ácido del mutante *apa1*. Aislamos seis transformantes que mostraban niveles de actividad ATPasa normales a pH ácido, tras someter a los transformantes restantes a la pérdida del plásmido, se vio en todos los casos cosegregación de crecimiento a pH ácido, actividad ATPasa y prototrofia a uracilo. Posteriormente, determinamos la extensión de la actividad complementaria, la cual se encontró en un fragmento de 3Kb. A continuación secuenciamos dicho fragmento de 3Kb completamente. El análisis de la secuencia reveló que sólo había una región de lectura abierta de 1.035 pares de bases.

---

La secuencia de la región codificante predice una proteína con 345 aminoácidos, cuyo peso molecular es aproximadamente de 39.KDa. El índice de uso de los codones (Bennetzen y Hall, 1982) de la proteína es de 0.47, que se corresponde con una proteína de bajo nivel de expresión (Sharp y Cowe, 1991). La hidropatía que se observa mediante el análisis del perfil de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle (1982) nos mostró que la proteína contenía seis dominios hidrofóbicos suficientemente largos como para considerarse segmentos transmembrana, solamente el tercer posible dominio transmembrana no está muy claro. No nos ha sido posible determinar en qué membrana se encuentra la proteína Apa1 ya que, anticuerpos generados contra el extremo carboxilo de Apa1, fallaron en detectar la proteína en homogenados de levadura. Nosotros pensamos que puede deberse a la baja expresión celular de Apa1 como nos indicaba el bajo índice de uso de los codones.

Una característica interesante de Apa1 es que en el supuesto dominio transmembrana 2, a partir del aminoácido 106, se observa un motivo denominado "cremallera de leucina". Esto nos hace suponer que al igual que ocurre en otras proteínas que contienen dicho dominio, la proteína Apa1 se encuentra formando dímeros en alguna membrana celular.

Una búsqueda en el EMBL/GenBank nos mostró que la secuencia de aminoácidos del gen APA1 es homóloga (47% identidad) a la secuencia del gen YCR34w localizado en el cromosoma III de levadura y (50% identidad) a la secuencia del gen JO343 localizado en el cromosoma X de levadura; en ambos genes, sus funciones son desconocidas (ver apartado 4.5. de resultados). Estos datos nos indujeron a pensar que podría existir una familia de genes relacionados entre sí en levadura.

Otro dato interesante es que APA1 muestra un alto grado de homología con el gen C40H1.4 que pertenece a un nematodo, *Caenorhabditis elegans*. Estos datos nos hacen pensar que la supuesta familia de genes en la que está incluido APA1 se extiende a organismos eucariontes pluricelulares.

A pesar del alto grado de homología existente entre las secuencias de los tres genes antes mencionados (APA1, JO343 y YCR34w), aparecen dos diferencias interesantes. La primera es que la "cremallera" de leucina existente en el gen APA1 no se encuentra en los otros dos genes, por lo que probablemente no tenga ningún sentido funcional. La otra variación es que la  $\alpha$ -hélice anfipática del extremo carboxilo terminal de la proteína Apa1 no aparece claramente en la proteína del gen JO343.

Para entender el papel del gen APA1 en la regulación de la ATPasa, creamos una cepa de levadura en la cual el gen APA1 estaba completamente delecionado y estudiamos su fenotipo bioquímico. Dicha cepa puede crecer en un medio con glucosa tamponado a pH neutro, pero no puede crecer en dicho medio a pH ácido. Posteriormente, examinamos la actividad ATPasa en membranas plasmáticas purificadas. En las cepas mutantes *apa1*, la actividad ATPasa fue menor que en las cepas parentales. La deleción de APA1 no modificó la constante de afinidad ( $K_m$ ) por ATP ni el pH óptimo, por contra, se observó una clara disminución en la  $V_{max}$ , sugiriéndonos que la reducción de la actividad ATPasa en el mutante se debía a una disminución de la concentración de la enzima en la membrana plasmática. Dicha hipótesis fue confirmada posteriormente mediante un análisis Western de membranas totales y membranas plasmáticas purificadas provenientes de cepas parentales y cepas mutantes. El nivel de ATPasa en ambos casos fue inferior en membranas provenientes de la cepa mutante y el hecho de que la concentración de ATPasa también fuera inferior en membranas totales, indicó que la enzima no se acumulaba en ningún otro

sistema de membrana. Dichos datos nos sugirieron que la reducción en los niveles de ATPasa mostrada en los mutantes *apa1* tenía que deberse a una reducción en la síntesis o estabilidad de la enzima.

Para determinar a qué se debía esta disminución de ATPasa en los mutantes *apa1*, realizamos un análisis Northern con cepas parentales y cepas mutantes. El resultado fue una disminución de los transcritos de ATPasa en la cepa mutante *apa1*. El efecto de la delección del gen *APA1* sobre la expresión del gen *PMA1* también fue estudiado mediante un análisis de la expresión del gen *PMA1-LacZ* fusionado sobre un plásmido monocopia en cepas mutantes y cepas parentales. El nivel de actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa mutante *apa1* fue en todos los casos la mitad frente a la cepa parental. Estos resultados insinúan que la delección del gen *APA1* afecta a los niveles de ATPasa de la membrana plasmática de levadura, modificando la síntesis de mRNA de *PMA1*, es decir, reduciendo la transcripción del gen y no actuando sobre la estabilidad de la enzima.

Recientemente, Rao y col. (1993) mostraron que la transcripción de la ATPasa de la membrana plasmática de levadura está regulada por glucosa. Nosotros pensamos que sería interesante ver si *APA1* estaba implicado en la regulación de la transcripción de *PMA1* por glucosa. Para ello, realizamos un análisis Northern de RNA total de las cepas *APA1* y  $\Delta$ *apa1::URA3* creciendo en glucosa o galactosa. Los transcritos de *PMA1* eran en mayor número en las células de la cepa *APA1* que crecieron en glucosa. En las cepas  $\Delta$ *apa1* que crecieron en glucosa, no observamos el aumento de mRNA de *PMA1* que esperábamos. Similares resultados observamos cuando estudiamos la expresión del gen *PMA1-LacZ* fusionado en un plásmido monocopia. Lo que nos hizo pensar que el gen *APA1* afectaba a la regulación del gen *PMA1* por glucosa y pensamos que, según el modelo de Rao y col., podía actuar sobre el factor *TUF/RAP1/GRF1*, que activa la transcripción del gen *PMA1*. Para comprobar si la delección de *APA1* afectaba a la expresión de otros genes cuya

expresión está regulada por el factor TUF/RAP1/GRF1 (Huet y col., 1985; Leer y col., 1985), realizamos un análisis Northern del RNA de cepas APA1 y cepas mutantes *apa1*, el cual nos mostró que la expresión de los genes TEF1, RP51, POL1, KRS1, PDC1, GAP1 y PGK1 no se ven afectados por la delección del gen APA1, por tanto no parece que exista una relación entre la delección del gen APA1 y el factor TUF/RAP1/GRF1. Por otro lado, si PMA1 codifica una proteína de membrana, pensamos que APA1 podía afectar la expresión de otros genes que codifican proteínas de membrana. Para saber si APA1 afectaba a genes que codifican proteínas de membrana, realizamos un análisis Northern y el resultado fue que la delección del gen APA1 no afectaba a la expresión de los genes GAL2 y TRK1, pero observamos una alteración significativa en los niveles de mRNA de los genes HXT3 y SNF3. Ambos genes son miembros de una familia de genes que codifican proteínas transportadoras de glucosa. Ni HXT3 ni SNF3 son esenciales para la viabilidad de la célula y con la expresión de alguno de los genes de dicha familia es suficiente para el crecimiento normal de las células en un medio con glucosa (Ko y col., 1993). Por otro lado, los niveles de mRNA del gen HXT1, otro miembro de la familia, no se vieron afectados por la delección del gen APA1.

Cuando medimos el transporte de glucosa en cepas APA1 y  $\Delta$ *apa1* en medios con distintas fuentes de carbono, observamos que el transporte de glucosa era menor en las cepas mutantes. Esto podía deberse al efecto de la delección del gen APA1 sobre la expresión de los genes HXT3 y SNF3, para descartar que ésta fuera la causa de la regulación por glucosa de la expresión de PMA1 por el mutante  $\Delta$ *apa1*, medimos si dichos genes (HXT3 y SNF3) y HXT1 en un plásmido multicopia suprimían el fenotipo de bajo crecimiento a pH ácido causado por la delección del gen APA1. Ninguno de los tres suprimía completamente dicho fenotipo. Cuando medimos el transporte de glucosa en dichas cepas, observamos que en el caso del gen HXT1 en un plásmido multicopia se suprimía el defecto causado por la mutación *apa1*. Estos

---

resultados nos indican que el control del gen PMA1 por el gen APA1 es funcionalmente independiente del transporte de glucosa.

No conocemos la función de la proteína Apa1, aunque algunos rasgos generales de su secuencia nos recuerdan una proteína de la familia que forma canales catiónicos, no hay ningún motivo estructural que nos sugiera una función clara para la proteína Apa1. Nosotros solamente podemos especular sobre el mecanismo de control ejercido por APA1 sobre la expresión de algunos genes. El hecho de que la delección del gen APA1 afecte a la expresión de genes inducibles por glucosa como PMA1, HXT3 Y SNF3 (Celenza y col., 1988; Ko y col., 1993; Özcan y col., 1995), sugiere que la proteína Apa1 podría actuar como un miembro más de las diversas vías de señalización de la glucosa que se han propuesto en levadura (Gancedo y col., 1985; Thevelein, 1992; Rao y col., 1993). Aunque no hemos podido identificar la localización celular de la proteína Apa1, la secuencia del gen APA1, nos sugiere que podría estar en una membrana de levadura. Si Apa1 estuviera localizada en la membrana plasmática, entonces parece razonable pensar que podría formar parte del complejo receptor de la glucosa, el cual es aún desconocido, y, a partir de este complejo, activar la transcripción de genes regulados por glucosa.

No obstante parece que el efecto de APA1 es más general que la regulación de la expresión de PMA1, HXT3 y SNF3. Recientemente, Aigle y colaboradores (Crouzet, M., y col., 1991, Desfarges, L. y col., 1993), han confirmado nuestros datos sobre APA1 y han comprobado que mutaciones en el gen APA1 afectan a diversos procesos celulares aparentemente no relacionados entre sí, como son: resistencia a inmunosupresores, resistencia a inhibidores de la síntesis de ergosterol, provoca una distribución defectuosa de los filamentos de actina y cambia la composición de la membrana plasmática por lo que parece que su efecto puede ser más generalizado.

---

Pensamos que el análisis bioquímico y molecular de los otros genes APA, junto con un análisis de supresión extragénica de la mutación *apa1-3*, nos ayudará a clarificar la función de la proteína Apa1 en *Saccharomyces cerevisiae* y el mecanismo de regulación de la transcripción del gen PMA1 por glucosa.

## **CAPITULO 6.- CONCLUSIONES.**



- 6.1.- Se han aislado mutaciones en 7 genes que afectan a los niveles de la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 6.2.- Se ha clonado y caracterizado uno de dichos genes (APA1). APA1 está implicado en la regulación de la expresión del gen de ATPasa de la membrana plasmática de levadura por glucosa.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

- 
- **Amigo, L., Moreno, E., y Lagunas, R. (1993).** «*In vivo inactivation of the yeast plasma membrane ATPase in the absence of exogenous catabolism*». Biochim. Biophys. Acta 1151, 83-88.
  - **Ausbel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., y Struhl, K. (1989).** «*Current protocols in molecular biology*». Greene publishing associates and wiley-interscience. New York. USA.
  - **Baker, H.V. (1991).** «*GCR1 of saccharomyces cerevisiae encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTC sequence motif*». Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 9443-9447.
  - **Benito, B., Portillo, F., y Lagunas, R. (1992).** «*In vivo activation of the yeast plasma membrane ATPase during nitrogen starvation*». FEBS lett. 300, 271-274.
  - **Bennetzen, J.L. y Hall, B.D. (1982).** «*Codon selection in yeast*». J. Biol. Chem. 257, 3026-3031.
  - **Bisson, L.F., Coons, D.M., Kruckeberg, A.L. y Lewis, D.A. (1993).** «*Yeast sugar transporters*». Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 28, 259-308.
  - **Bisson, L. y Fraenkel, D.G. (1983).** «*Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by Saccharomyces cerevisiae*». Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 1730-1734.
  - **Bisson, L. y Fraenkel, D.G. (1983).** «*Transport of 6-deoxyglucose in Saccharomyces cerevisiae*». J. Bacteriol. 155, 995-1000.

- 
- **Bitter G.A., Chang, K.K.H., y Egan, K.M. (1991).** *«A multicomponent upstream activation sequence of the Saccharomyces cerevisiae glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase gene promoter»*. Mol. Gen. Genet. 231, 22-32.
  - **Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J., y Gotschlich, E.C. (1984).** *«A rapid, sensitive method for deletion of alkaline phosphatase conjugated anti-antibody on western blots»* Anal. Biochem. 136, 175-179.
  - **Borst-Pauwels, G.W.F.H. (1981).** *«Ion transport in yeast»*. Biochim. Biophys. Acta 650, 88-127.
  - **Botstein, D. y Fink, G.R. (1988).** *«Yeast: an experimental organism for modern biology»*. Science. 240, 1439-1443.
  - **Bradford, M.M. (1976).** *«A rapid and sensitive method the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding»*. Anal. Biochem. 72, 248-254.
  - **Brandl, C.J. y Deber, C.M. (1986).** *«Hypothesis about the function of membrane-buried proline residues in transport proteins»*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 917-921.
  - **Bullock y col. (1987).** *«XLI Blue»*. Biotechniques. 5, 376-378.
  - **Burnette, W.N. (1981).** *«Western Blotting: Electrophoresis transfer of proteins from sodium docedyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein»*. Anal. Biochem. 112, 195-203.

- 
- **Chambers, A., Stanway, C., Kingsman, A.J., y Kingsman, S.M. (1988).** *«The UAS of the yeast PGK gene is composed of multiple functional elements».* Nucleic. Acids. Res. 16, 8245-8259.
  - **Campell, I. y Duffus, J.H. (1988).** *«Yeast».* IRL Press Limited. Oxford. England.
  - **Capieaux, E., Vignais, M.L., Sentenac, A., y Goffeau, A. (1989).** *«The yeast H<sup>+</sup>-ATPase gene is controlled by the promoter binding factor TUF».* J. Biol. Chem. 264, 7437-7446.
  - **Carlson, M. y Botstein, D. (1982).** *«Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase».* Cell. 28, 145-154.
  - **Casadaban, M.J., Martínez-Arias, A., Shapira, S.K., y Chou, I. (1983).** *«β-galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in Escherichia coli and yeast».* Methods Enzymol. 100, 293-308.
  - **Celenza, J.L., Marshall-Carlson, L. y Carlson, M. (1988).** *«The yeast SNF3 gene encodes a glucose transporter homologous to the mammalian protein».* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 2130-2134.
  - **Crouzet, M., Urdaci, M., Dulau, L. y Aigle, M. (1991).** *«Yeast mutant affected for viability upon nutrient starvation: characterization and cloning of the RVS161 gene».* Yeast. 7, 727-743
  - **Desfarges, L., Durrens, P., Juguelin, H., Cassagne, C., Bonneau, M. y Aigle, M. (1993).** *«Yeast mutants affected in viability upon starvation have a modified phospholipid composition».* Yeast. 9, 267-277.

- 
- **Deveraux, J., Haerberli, P. y Smithies, O. (1984).** «*A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX*». *Nucleic. Acids. Res.* 12, 387.
  - **Dobson, M.J., Tuite, M.F., Roberts, N.A., Kingsman, A.J., Kingsman, S.M., Perkins, R.E., Conroy, S.C., Dunbar, B. y Fothergill, L.A. (1982).** «*Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae**». *Nucleic. Acids. Res.* 10, 2.625-2.637.
  - **Dunn, S.D. (1986).** «*Effects of the modification of transfers buffer composition and the renaturation of protein in gels on the recognition of proteins in Western blots by monoclonal antibodies*». *Anal. Biochem.* 15, 144-153.
  - **Eraso, P., Cid, A. y Serrano, M. (1987).** «*Tight control of the amount of yeast plasma membrane ATPase during changes in growth conditions and gene dosage*». *FEBS lett.* 224, 193-197.
  - **Eraso, P., Mazón, M.J. y Gancedo, J.M. (1987).** «*Internal acidification and cAMP increase are not correlated in *Saccharomyces cerevisiae**». *Eur. J. Biochem.* 165, 671-674.
  - **Eraso, P. y Gancedo C. (1987).** «*Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth*». *FEBS lett.* 224, 187-192.
  - **Eraso, P. y Portillo, F. (1994).** «*Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane  $H^+$ -ATPase by glucose*». *J. Biol. Chem.* 269, 10393-10399.
  - **Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983).** «*A technique for radiolabelling DNA fragments to high specific activity*». *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
  - **Gaber, R.F. (1992).** «*Molecular genetics of yeast ion transport*». *Int. Rev. Cytol.* 137A, 299-353.

- 
- **Gancedo, J.M., Mazón, M.J. y Eraso, P. (1985).** «*Biological roles of cAMP: similarities and differences between organism*». Trends Biochem. Sci. 10, 210-212.
  - **Gerster, T. y Roeder, R.G. (1988).** «*A herpesvirus trans-activating protein interacts with transcription factor OTF1 and other cellular proteins*». Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 6347-6351.
  - **Goffeau, A. y Slayman, C.W. (1981).** «*The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane*». Biochim. Biophys. Acta 639, 197-223.
  - **Goffeau, A. y Green, N.M. (1990).** «*In Monovalent cations in biological system*». (Pasternak, C.A., ed) pp 155-169, CRC Press. Boca Raton, Fl. USA.
  - **Goffeau, A., Slonimski, P., Nakai, K. y Risler, J.L. (1993).** «*How many yeast genes code for membrane-spanning proteins?*». Yeast. 9, 691-702.
  - **Guarente, L., Yocum, R.R. y Gifford, P. (1982).** «*A GAL10-CYC1 hybrid yeast promoter identifies the GAL4 regulatory region as an upstream site*». Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70, 7410-7414.
  - **Guthrie, C. y Fink, G.R. (1991).** «*Guide to yeast genetics and molecular biology*». Vol. 194 Academic Press. Inc. San Diego, California. EEUU.
  - **Hanahan, D. (1983).** «*Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*». J. Mol. Biol. 166, 557-580.
  - **Hanahan, D. (1986).** «*Techniques for transformation of E. Coli in DNA cloning*». vol. I, pp 109-135. (Glover D.M. ed). IRL Press. Oxford. England.

- 
- **Herskowitz, I. y Jensen, R.E. (1991).** *«Putting the HO gene to work; practical uses for mating-type switching».* Meth. Enzimol. 194, 132-146.
  - **Hesse, J.E., Wieczorek, L., Altendorf, K., Reicin, A.S., Dorus, E. y Epstein, W. (1984).** *«Sequence homology between two membrane transport ATPases, the K<sup>+</sup>-ATPase of E. Coli and the Ca<sup>++</sup>-ATPase of Sarcoplasmic reticulum».* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81, 4746-4750.
  - **Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. y Tzagoloff, A. (1986).** *«Yeast/E. Coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites».* Yeast. 2, 163-167.
  - **Hoffman, C.S. y Winston, F. (1987).** *«A ten minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of E. Coli».* Gene. 57, 266-272.
  - **Holmes, D.S. y Quigley, M. (1981).** *«A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids».* Anal. Biochem. 114, 193-198.
  - **Huet, J., Cottrelle, P., Cool, M., Vignais, M.L., Thiele, D., Marck, C., Bruler, J.H., Sentenac, A. y Fromageot, P. (1985).** *«A general upstream binding factor for genes of the yeast translational apparatus».* EMBO J. 4, 3539-3547.
  - **Huie, M.A., Scott, E.W., Drazinic, C.M., López, M.C., Hornstra, I.K., Yang, T.P. y Baker, H.V. (1992).** *«Characterization of the DNA-binding activity of GCRI: In vivo evidence for two GCRI-binding sites in the upstream activating sequence of TP1 of Saccharomyces cerevisiae».* Mol. Cel. Biol. 12, 2690-2700.
  - **Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. y Kimura, A. (1983).** *«Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations».* J. Bacteriol. 153, 163-168.



- 
- Jones, J.S. y Prakash, L. (1990). «Yeast *Saccharomyces cerevisiae* selectable markers in pUC 18 polylinkers». *Yeast*. 6, 363-366.
  - Jorgensen, P.L. y Andersen, J.P. (1988). «Structural basis for  $E_1$ - $E_2$  conformational transition in Na, K-pump and Ca-pump proteins». *J. Membr. Biol.* 103, 95-120.
  - Ko, C.H., Liang, H. y Gaber, R.F. (1993). «Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*». *Mol. Cell. Biol.* 13, 638-648.
  - Kyte, J. y Doolittle, R.F. (1982). «A simple method for displaying the hydropathic character of a protein». *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
  - Laemmli, U.K. (1970). «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». *Nature*. 227, 680-685.
  - Leer, R.J., Van Raamsdonk-Duin, M.M.C., Mager, W. y Planta, R.J. (1985). «Conserved sequences upstream of yeast ribosomal genes». *Curr. Genet.* 9, 273-277.
  - Lentzen, H., Arreguin, M., Kappeli, O., Fiechter, A. y Fuhrmann, G.F. (1987). «Bioregulation of yeast plasma membrane ATPase and carnitin acetyl transferase (CAT) activity at defined metabolic states. *J. Biotechnol.* 6, 281-291.
  - Lerach, R.H., Diamond, D., Wozney, J.M. y Boedtker, H. (1977). «RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination». *Biochemistry*. 16, 4743-4751.

- 
- **Lue, N.F. y Kornberg, R.D. (1987).** «*Accurate initiation at RNA polymerase II promoters in extracts from *Saccharomyces cerevisiae**». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 8839-8843.
  - **Mandala, S.M. y Slayman, C.W. (1989).** «*The amino and carboxyl termini of the *Neurospora* plasma membrane  $H^+$ -ATPase are cytoplasmically located*». *J. Biol. Chem.* 264, 16276-16281.
  - **McCusker, J.H., Perlin, D.S. y Haber, J.E. (1987).** «*Pleiotropic plasma membrane ATPase mutation of *Saccharomyces cerevisiae**». *Mol. Cell. Biol.* 7, 4082-4088.
  - **Messing, J. (1983).** «*New M13 vectors for cloning*». *Methods. Enzymol.* 101, 20-78.
  - **Miller, J. (1972).** «*Experiments in molecular biology*». Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. EEUU.
  - **Monk, B.C., Montesinos, C., Ferguson, C., Leonard, K. y Serrano, R. (1991).** «*Immunological approaches to the transmembrane topology and conformational changes of the carboxyl-terminal regulatory domain of yeast plasma membrane  $H^+$ -ATPase*». *J. Biol. Chem.* 266, 18097-18103.
  - **Myers, A.M., Tzagoloff, A., Kinney, D.H. y Lusty, C.J. (1986).** «*Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of LacZ fusions*». *Gene.* 45, 299-310.
  - **Navarre, C., Ghislain, M., Leterme, S., Ferroud, C., Dufour, J.P. y Goffeau, A. (1992).** «*Purification and complete sequence of a small proteolipid associated with the plasma membrane  $H^+$ -ATPase of *Saccharomyces cerevisiae**». *J. Biol. Chem.* 267, 6425-6428.

- 
- Oliver, S.G., y col. (1992). «*The complete DNA sequence of yeast chromosome III*». *Nature*. 357, 657-678.
  - Özcan, S. y Johnston, M. (1995). «*Glucose induction of hexose transporters (HXT) genes in Saccharomyces cerevisiae*». *Proceedings of the 17th Int. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology*. Lisboa, Portugal.
  - Pedersen, P.L. y Carafoli, E. (1987). «*Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties and significance to cell-functions. II. Energy coupling and work output*». *Trends Biochem. Sci.* 12, 146-150.
  - Perlin, D.S., Brown, C.L. y Haber, J.E. (1988). «*Membrane potential defect in hygromycin B resistant pma1 mutants of Saccharomyces cerevisiae*». *J. Biol. Chem.* 263, 18118-18122.
  - Perlin, D.S., Harris, S.L., Seto-Young, D. y Haber, J.E. (1989). «*Defective H<sup>+</sup>-ATPase of hygromycin B resistant pma1 mutants from Saccharomyces cerevisiae*». *J. Biol. Chem.* 264, 21857-21864.
  - Portillo, F. y Mazón, M.J. (1986). «*The Saccharomyces cerevisiae start mutant carrying the cdc 25 mutation is defective in activation of plasma membrane ATPase by glucose*». *J. Bacteriol.* 168, 1254-1257.
  - Portillo, F., Eraso, P. y Serrano, R. (1991). «*Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase by directed mutagenesis and intragenic suppression*». *FEBS lett.* 287, 71-74.
  - Portillo, F., Larrinoa, I.F. y Serrano, R. (1989). «*Deletion analysis of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase and indentification of a regulatory domanin at the carboxyl-terminus*». *FEBS lett.* 247, 381-385.

- 
- **Portillo, F. y Serrano, R. (1988).** «*Dissection of functional domains of the yeast proton-pumping ATPase by directed mutagenesis*». EMBO J. 7, 1793-1798.
  - **Portillo, F. y Serrano, R. (1989).** «*Growth control strength and active site of yeast plasma membrane ATPase studied by site-directed mutagenesis*». Eur. J. Biochem. 186, 501-507.
  - **Purnellé, B., Coster, F. y Goffean, A. (1994).** «*Yeast sequencing reports*». Yeast. 10, 1235-1249.
  - **Radloff, R., Bawer, W. y Vinograd, J. (1967).** «*A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells*». Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 55, 1514-1518.
  - **Rao, R., Drummond-Barbosa, D. y Slayman, C.W. (1993).** «*Transcriptional regulation by glucose of the yeast PMA1 gene encoding the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase*». Yeast. 9, 1075-1084.
  - **Ronne, H. (1995).** «*Glucose repression in fungi*». TIGS. 11, 12-17.
  - **Rosa, M.F. y Sá-Correia, I. (1991).** «*In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of S. cerevisiae*». Appl. Environ. Microbiol. 57, 830-835.
  - **Rose, M.D., Hieter, P. y Winston, F. (1990).** «*Methods in yeast genetics, a Laboratory course manual*». Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Nueva York. USA.
  - **Rose, M.D., Novick, P., Thomas, J.H., Botstein, D. y Fink, G.R. (1987).** «*A Saccharomyces cerevisiae genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector*». Gene. 60, 237-243.

- 
- **Rose, M. y Winston, F. (1984).** *«Identification of a Ty insertion within the coding sequence of the Saccharomyces cerevisiae URA 3 gene»*. Mol. Gen. Genet. 193, 557-560.
  - **Rothstein, R. (1985).** *«Cloning in Yeast»*. Cap. 3 (pp45-46) del libro DNA Cloning, Vol. II (Glover, D.M., ed). IRL Press. Oxford. England.
  - **Sambrook, J., Maniatis, T., y Fritsch, E.F. (1982).** *«Molecular cloning»*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. EEUU.
  - **Sanger, F., Niklen, S. y Coulson, A.R. (1977).** *«DNA sequencing with chain-terminating inhibitors»*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.
  - **Scarborough, G.A. y Hennessey, J.P. (1990).** *«Direct evidence for the cytoplasmatic location of the NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal ends of the Neurospora crassa plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase»*. J. Biol. Chem. 265, 532-537.
  - **Scott, E.W. y Baker, H.V. (1993).** *«Concerted action of the transcriptional activators REB1, RAP1 y GCR1 in the high-level expression of the glycolity gene TPI»*. Mol. Cell. Biol. 13, 543-550.
  - **Serrano, R. (1983).** *«In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase»*. FEBS Lett. 156, 11-14.
  - **Serrano, R. (1984).** *«Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump»*. Curr. Top. Cell. regul. 23, 87-126.
  - **Serrano, R. (1985).** *«Plasma membrane ATPase of plants and fungi»*. CRC Press. Boca Ratón. Florida. USA.

- 
- Serrano, R., Montesinos, C. y Cid, A. (1986). «*A temperature-sensitive mutant of the yeast plasma membrane ATPase obtained by in vitro mutagenesis*». *FEBS Lett.* 208, 143-146.
  - Serrano, R. (1988). «*Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi*». *Biochim. Biophys. Acta* 947, 1-28.
  - Serrano, R. (1989). «*Structure and function of plasma membrane ATPase*». *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 40, 61-94.
  - Serrano, R. (1991). «*The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genome dynamics, protein synthesis and energetics*». (Broac, J.R., Pringle, J. y Jones, E.W., eds). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. New York. USA.
  - Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C. y Fink, G.R. (1986). «*Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with  $(Na^+ + K^+)$ ,  $K^+$  and  $Ca^{++}$  ATPases*». *Nature.* 319, 689-693.
  - Serrano, R. y Portillo, F. (1990). «*Catalytic and regulatory sites of yeast plasma membrane  $H^+$ -ATPase studied by directed mutagenesis*». *Biochim. Biophys. Acta* 1018, 195-199.
  - Serrano, R., Portillo, F., Monk, B.C. y Palmgren, M.G. (1992). «*The regulatory domain of fungal and plant plasma membrane  $H^+$ -ATPase*». *Acta Physiol Scand.* 146, 131-136.
  - Sharp, P.M. y Cowe, E. (1991). «*Synonymous codon usage in *Saccharomyces cerevisiae**». *Yeast.* 7, 657-678.

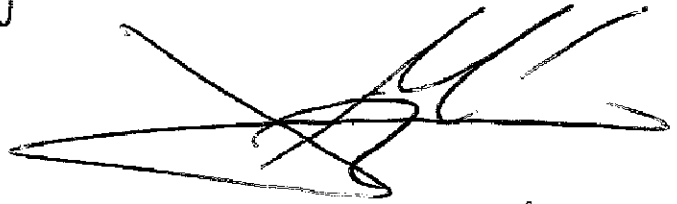
- 
- **Sherman, F., Fink, G.R. y Hicks, J.B. (1986).** «*Methods in yeast genetics*». Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York. USA
  - **Sikorski, R.S. y Hieter, P. (1989).** «*A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae**». Genetics. 122, 19-27.
  - **Slayman C.L. (1987).** «*The plasma membrane ATPase of *Neurospora*: a proton-pumping electroenzyme*». J. Bioenerg. Biomembr. 19, 1-20.
  - **Southern, E.M. (1975).** «*Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*». J. Mol. Biol. 98, 503-517.
  - **Taylor, J.W., Schmidt, W., Cosstick, R., Okruszckk, A. y Eckstein, F. (1989).** «*The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA*». Nucl. Acids. Res. 13, 8749-8763.
  - **Theodoris, G., Fong, N.M., Coons, D.M. y Bisson, L.F. (1994).** «*High-copy suppression of glucose transport defects by *HXT4* and regulatory elements in the promoters of the *HXT* genes in *S. cerevisiae**». Genetics. 137, 957-966.
  - **Thevelein, J.M. (1992).** «*The RAS-adenylate cyclase pathway and cell cycle control in *S. cerevisiae**». Antonie van Leeuwenhoek. 62, 109-130.
  - **Thierry, A., Fairhead, C. y Dujon, B. (1990).** «*The complete sequence of the 8.2kb segment left of *MAT* on chromosome III reveals five ORF's, including a gene for a yeast ribokinase*». Yeast. 6, 521-534.
  - **Thomas, B.J. y Rothstein, R. (1989).** «*Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA*». Cell. 56, 619-630.

- 
- Tornow, J., Zeng, X., Gao, W. y Santangelo, G.M. (1993). «*GCR1, a transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*, complexes with RAP1 and can function without its DNA binding domain*». EMBO J. 12, 2431-2437.
  - Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). «*Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets*». Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 4350-4354.
  - Tuduri, P., Nso, E., Dufour, J.P. y Goffeau, A. (1985). «*Decrease of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase activity during late exponential growth of *S. cerevisiae**». Biochem. Biophys. Res. Commun. 133, 917-922.
  - Uemura, H. y Fraenkel, D.G. (1990). «*gcr2, a new mutation affecting glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae**». Mol. Cell. Biol. 10, 6389-6396.
  - Ulaszewski, S., Hilgel, F. y Goffeau, A. (1989). «*Cyclic AMP controls the plasma membrane  $H^+$ -ATPase activity from *Saccharomyces cerevisiae**». FEBS Lett. 245, 131-136.
  - Ulaszewski, S., Van Herck, J.C., Dufour, J.P., Kulpa, J., Nieuwenhuis, B. y Goffeau, A. (1987). «*A single mutation confers vanadate resistance to the plasma membrane  $H^+$ -ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe**». J. Biol. Chem. 262, 223-228.
  - Vallejo, C.G. y Serrano R. (1989). «*Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane  $H^+$ -ATPase*». Yeast. 5, 307-319.
  - Vieira, J. y Messing, J. (1982). «*The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers*». Gene. (Amst.). 19, 259-268.



- 
- Wach, A., Schlessner, A. y Goffeau, A. (1992). «An alignment of 17 deduced protein sequences from plant, fungi and ciliate  $H^+$ -ATPase genes». J. Bioenerg. Biomembr. 24, 309-317.
  - Walsh, M.C., Smits, H.P., Scholte, M. y Van Dam, K. (1994). «Affinity of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated during growth on glucose». J. Bacteriol. 176, 953-958.
  - Ward, A.C. (1990). «Single-step purification of shuttle vectors from yeast of high frequency back-transformation into *E. coli*». Nucl. Acids. Res. 18, 5319.
  - Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985). «Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 y pUC19 vectors». Gene. (Amst.). 33, 103-119.
  - Zaret, K.S. y Sherman, F. (1982). «DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast». Cell. 28, 563-573.

... prescribe en el día  
de la ... Tesla  
... Apto en laude - por unanimidad!  
4 julio 1992



Mano Cepus

